

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA DALLA VECCHIA

**EFEITO DA CETAMINA EM SINTOMAS MOTORES E NÃO MOTORES DA
DOENÇA DE PARKINSON NO MODELO ANIMAL DE 6-OHDA.**

CURITIBA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA DALLA VECCHIA

**EFEITO DA CETAMINA EM MODELO ANIMAL DE 6-OHDA DA DOENÇA DE
PARKINSON**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

Coorientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Vecchia, Débora Dalla

Efeito da cetamina em modelo animal de 6-OHDA da Doença de
Parkinson./ Débora Dalla Vecchia. – Curitiba, 2017.
85 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Roberto Andreatini

Coorientador: Edmar Miyoshi

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Parkinson, Doença de. 2. Cetamina. 3. Dopamina. I. Título II.
Andreatini, Roberto. III. Miyoshi, Edmar. IV. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DEBORA DALLA VECCHIA** intitulada: **EFEITO DA CETAMINA EM SINTOMAS MOTORES E NÃO MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON NO MODELO ANIMAL DE 6-OHDA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

Aprovação

Curitiba, 24 de Fevereiro de 2017.

ROBERTO ANDREATINI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Avaliador Interno (UFPR)

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA
Avaliador Interno (UFPR)

PATRÍCIA ANDRÉIA DOMBROWSKI
Avaliador Externo (PUC/PR)

MARCELO MACHADO FERRO
Avaliador Externo (UEPG)

*Para a minha família: Inês, Adroaldo e
Eduardo pelo apoio, amor e cuidado.
Para o Marcus, meu maior incentivador,
meu companheiro e meu amor.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais **Inês** e **Adroaldo**, por todo o carinho, cuidado e amor que sempre me dedicaram. Em especial, agradeço pela paciência durante o período de pós-graduação, por compreenderem a minha ausência em prol do trabalho e por me incentivarem em todos os sentidos. Eu sei que para que eu chegasse até aqui, vocês renunciaram muitas coisas e sofreram calados em vários momentos. Não existem palavras que expressem a minha gratidão e o orgulho que sinto por ser filha de vocês. Todas as minhas conquistas serão sempre nossas. Obrigada por apoiarem o meu sonho. Meu amor por vocês é incondicional.

Agradeço ao meu irmão **Eduardo**, por usar sua inteligência lógica para me ajudar na organização dos dados. Obrigada pela parceria, pelos puxões de orelha e por, mesmo de longe, estar sempre presente ao longo dessa jornada. Amo você, criança.

Ao meu amor **Marcus**, muito obrigada por tudo. Por acreditar em mim quando eu mesma não acredito. Por me incentivar todos os dias. Por cuidar de mim. Por me fazer rir. Por me ajudar a enxergar o lado bom das coisas. Por ser meu companheiro em todos os momentos. Por ter tornado a minha vida muito melhor. Você é minha inspiração. Obrigada por me ensinar tanto e por ser maravilhoso, em tudo que você faz. Eu te amo, até o fim.

Meu eterno agradecimento ao **Professor Roberto Andreatini**, meu orientador, que confiou em mim ao me aceitar como orientada e foi fundamental para o desenvolvimento dessa tese e também uma grande inspiração profissional. Foi um privilégio receber seus valiosos conselhos e ensinamentos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, muito obrigada! **Luiz, Etiéli e Palloma**, vocês foram essenciais na execução desse projeto. Obrigada por toda ajuda, pela amizade e pela irmandade que desenvolvemos. Foi uma honra trabalhar com vocês.

Em especial, agradeço ao melhor amigo que eu poderia ter **Luiz Kae Sales Kanazawa**. Agradeço por cada momento compartilhado, pelos risos,

desabafos, cafés que duravam a tarde toda, comilanças, longas conversas e pela parceria incondicional (perto ou longe). Você é uma das pessoas a quem mais admiro e respeito, pelo seu caráter, pela sua inteligência e pela sua capacidade de ver o outro além de si mesmo. Aprendi muito com você ao longo desses anos de convivência. Não sei o que seria da minha vida sem a sua amizade. Te amo para sempre.

A minha amiga **Etiéli Wendler**, obrigada por ter me acolhido assim que cheguei totalmente perdida na Farmacologia. Obrigada por ter se tornado uma amiga tão especial que foi crucial ao longo de todos esses anos. Obrigada por me acolher também tantas vezes em sua casa e por ser ter sido minha companheira de aventuras em um pedacinho do intercâmbio. Nunca vou esquecer de todos os nossos momentos. Amo você.

Bruna Mariana, Adriano e Luiz, obrigada pela parceria e amizade para toda a vida desenvolvidas na Representação Discente. Vocês se tornaram prioridade na minha “ordem do dia”. Obrigada pelas agradáveis longas horas de trabalho em grupo. Foi árduo, porém, divertido. Obrigada pelas conversas filosóficas ao longo da madrugada, por todas as reuniões extraordinárias para discutirmos nossas próprias vidas. Quero que saibam da minha admiração e do meu grande amor por vocês.

Obrigada aos amigos que o Doutorado Sanduíche me deu de presente: **Liliana, Lívia, Suzanny, Fernando e Guilherme**. Vocês não fazem ideia do quanto tornaram esse período da minha vida mais agradável e o quanto me ensinaram. Alguns pessoalmente, outros virtualmente, compartilhar nossas histórias e experiências diariamente, foi maravilhoso. Em especial a **Liliana, Lívia e Suzanny**, companheiras de viagens, aventuras, desesperos, risadas, entre outros. Vocês são fantásticas! Eu não teria conseguido sem vocês. Se não amei, não me lembro.

Liliana, obrigada por ter estado comigo em todos os momentos e por ter me salvado quando mais precisei. Você foi a minha família no intercâmbio e é uma honra continuar desfrutando de sua companhia. Você não faz ideia do quanto é importante para mim.

Expresso também a minha gratidão a todos os meus colegas da Farmacologia do Sistema Nervoso Central: **Lilian, Meira, Taysa, Laura, Ana Paula, Vinícius, Camila, Bruno, Thiago, Cristina**. Pela camaradagem, pelas festas, pelas risadas e pelo convívio diário. Em especial, a **Ana** e o **Thiago** pela fundamental ajuda nos experimentos.

Meu sincero agradecimento ao **Professor Rainer Schwarting** por me receber na Philipps-Universität Marburg no Doutorado Sanduiche, por toda gentileza e por me proporcionar um olhar diferente para a ciência. Estendo o agradecimento a todos os colegas de laboratório: **Markus, Luan, Liana, Tobias, Alex, Dominik, Özge, Moria, Teresa e Sebastian**. Foi uma experiência incrível, onde aprendi e cresci muito.

Agradeço aos meus amigos da vida, que sempre me incentivaram e compartilharam comigo tantos momentos importantes ao longo de toda a minha jornada: **Laryssa, Karine, Silvielen, William, Marina e Monique**. Amo vocês.

Ao meu coorientador **Professor Edmar Miyoshi**, por ter aceitado continuar a parceria iniciada na UEPG. Agradeço por ter me ensinado tanto e me apoiado a seguir na ciência. Você é um grande exemplo para mim.

Agradeço aos demais **Colegas do Departamento de Farmacologia**, pelos momentos de descontração.

Agradeço aos **Professores do Departamento de Farmacologia**, pela dedicação e conhecimento com que nos ensinam.

Agradeço a todos os **Funcionários do Departamento de Farmacologia**, pelo trabalho desempenhado com carinho.

Obrigada a **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e da realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

*“É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais
esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no
meu coração do que medo na minha cabeça.”*

Lora Coralina

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) se caracteriza pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc), levando a redução de dopamina em toda a via nigroestriatal. Esse é o principal mecanismo fisiopatológico envolvido com o desenvolvimento dos sintomas motores da doença. Entre esses sintomas, podemos destacar as alterações da fala, que aparecem precocemente. Os sintomas não motores, como a depressão (que pode ser desenvolvida precocemente) e o prejuízo de memória (que se agrava com o decorrer da doença) pioram substancialmente a qualidade de vida desses pacientes. Esses sintomas podem ser reproduzidos em modelos animais da DP. A cetamina é um antagonista de receptor N-metil D-aspartato (NMDA) do glutamato e apresenta atividade antidepressiva rápida e duradoura, quando administrada uma vez por semana. Além disso, antagonistas de NMDA parecem reverter prejuízos de memória procedural. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da cetamina em sintomas da DP em modelo animal bilateral intranigral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Através do teste de preferência por sacarose e natação forçada modificada, foi identificada atividade antidepressiva da cetamina nos ratos lesionados com 6-OHDA nas três doses testadas (5, 10 e 15mg/kg), bem como a reversão do prejuízo de memória social desses animais. A imunohistoquímica de Tirosina Hidroxilase (TH) não demonstrou reversão da perda da população de neurônios dopaminérgicos na SNpc. Além disso, a lesão com 6-OHDA provocou alterações vocais nos ratos, identificadas pelo teste de vocalização ultrassônica (USV). Em paralelo, alguns parâmetros motores referentes a marcha do animal se mostraram alterados no teste catwalk. As alterações vocais não foram revertidas pela cetamina. A redução de USVs não está relacionada com o comportamento tipo depressivo, ressaltando sua ligação com o distúrbio motor. Assim, concluiu-se que a cetamina apresenta atividade interessante na reversão rápida e duradoura da depressão e das alterações na marcha e do comprometimento de memória, indicando um perfil promissor para uso clínico na DP.

Palavras- Chaves: Doença de Parkinson, Depressão, Memória, Vocalização Ultrassônica, Catwalk.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra *pars compacta* (SNpc), leading to the reduction of dopamine throughout the nigrostriatal pathway. This is the main pathophysiological mechanism involved with the development of the motor symptoms of the disease. Among these symptoms, we can highlight the speech changes, which appear early. Non-motor symptoms, such as depression (which may be developed early) and memory impairment (which worsens with disease progress) substantially reduce life quality of these patients. These symptoms may be reproduced in animal models of PD. Ketamine is an N-methyl D-aspartate (NMDA) antagonist of glutamate receptor and exhibits rapid and lasting antidepressant activity when administered once a week. In addition, NMDA antagonists appear to reverse procedural memory impairments. Thus, the objective of the present study was to evaluate the activity of ketamine in PD symptoms in a bilateral intranigral animal model of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Through the preference test for sucrose and modified forced swimming, antidepressant activity of ketamine in 6-OHDA-injured rats was identified in the three doses tested (5, 10 and 15mg / kg), similarly, ketamine caused a reversal of the social memory impairment of these animals. Immunohistochemistry of Tyrosine Hydroxylase (TH) did not demonstrate reversal of the population loss of dopaminergic neurons in the SNPC. In addition, 6-OHDA injury provoked vocal changes in the rats, identified by the ultrasonic vocalization test (USV). In parallel, some motor parameters related to the gait of the animal were altered in the catwalk test. The vocal changes were not reversed by ketamine. The reduction of USVs is not related to the depressive type behavior, emphasizing its connection with the motor disorder. Thus, it was concluded that ketamine presents interesting activity in the rapid and long-term reversion of depression and changes in gait and memory impairment, indicating a promising profile for clinical use in PD.

Key Words: Parkinson's Disease, Depression, Memory, Ultrasonic Vocalization, Catwalk.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP	Doença de Parkinson
DA	Doença de Alzheimer
OMS	Organização Mundial da Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SNpc	Substância Negra <i>pars compacta</i>
NMDA	N-metil D-aspartato
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
IP	Intraperitonalmente
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
COX-2	Ciclooxigenase 2
USV	Vocalizações Ultrassônicas
TGI	Trato Gastrointestinal
DM	Depressão Maior
5-HT	Serotonina
NA	Noradrenalina
L-DOPA	Levodopa
COMT	Catecol-orto-metil-transferase
IMAOB	Inibidores da monoamino oxidase B
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
SNC	Sistema nervoso central
MK-801	Dizolcipina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
TH	Tirosina Hidroxilase
TH-ir	TH-imunorreativos
UFPR	Universidade Federal do Paraná
AP	Ântero posterior
ML	Médio Lateral
DV	Dorso Ventral
SC	Subcutânea
IM	Intramuscular
LCR	Líquido cefalorraquidiano
TPS	Teste de preferência por sacarose
TNFM	Teste de Natação Forçada Modificada
TRS	Teste de Reconhecimento Social
RID	Ratio of Investigation Duration
TCA	Teste de Campo Aberto
FM	Frequência modulada
RF	Right front
RH	Right hind
mTOR	Proteína alvo na sinalização da rapamicina mamária
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
EPM	Erro padrão da Média
CPP	Ácido 3- (2-carboxipiperazin-4-il) propil-1-fosfônico

FIGURAS e TABELAS

Figura 1: Tipos de USVs.

Figura 2: Representação esquemática do experimento 1.

Figura 3: Efeito da lesão nigral bilateral no teste de preferência de sacarose antes do tratamento com drogas.

Figura 4: Efeito do tratamento farmacológico no Teste de Preferência de Sacarose de ratos com lesão de Substância Negra *pars* Compacta (SNpc).

Figura 5: Efeito do tratamento farmacológico no teste de natação forçada modificada em ratos lesados com 6-OHDA.

Figura 6: Efeito do tratamento farmacológico no Teste de Reconhecimento Social em ratos com lesão bilateral da Substância Negra *pars* Compacta (SNpc).

Figura 7: Efeito do tratamento farmacológico em neurônios da substância negra *pars* compacta (SNpc) com Tirosina Hidroxilase (TH), em ratos com lesão de 6-OHDA e SHAM.

Figura 8: Representação esquemática do experimento 2

Figura 9: Efeito da lesão bilateral com 6-OHDA da SNpc no teste de preferência de sacarose antes do tratamento farmacológico.

Figura 10: Efeito do tratamento farmacológico no Teste de Preferência por Sacarose de ratos lesados com 6-OHDA bilateralmente na SNpc.

Figura 11: Efeito da lesão bilateral com 6-OHDA na Substância Negra *pars* Compacta (SNpc) no teste de vocalização ultrassônica.

Figura 12: Efeito da lesão bilateral com 6-OHDA na Substância Negra *pars* Compacta (SNpc) no teste de vocalização ultrassônica.

Figura 13: Efeito do tratamento farmacológico no Teste de Vocalização Ultrassônica de ratos lesados com 6-OHDA na Substância Negra *pars* Compacta (SNpc).

Figura 14: Efeito da lesão bilateral com 6-OHDA na substância negra *pars compacta* (SNpc) no teste Catwalk e do tratamento com cetamina

Figura 15: Correlações entre o parâmetro da marcha (duração da corrida), USV de 50 kHz e teste de preferência de sacarose em ratos com lesão bilateral da substância negra *pars compacta* (SNpc) (induzida por 6-OHDA).

TABELAS

Tabela 1: Efeito da cetamina e imipramina no teste de campo aberto em ratos com lesão bilateral de Substância Negra *pars Compacta* induzida por 6-OHDA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON	16
1.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	16
1.3 ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	17
1.3.1 Modelos Animais da Doença de Parkinson.....	18
1. 4 SINTOMAS.....	19
1.4.1 Sintomas Motores da Doença de Parkinson	19
1.4.1.1 Alterações Vocais.....	20
1.4.2 Sintomas Não Motores da Doença de Parkinson	21
1.4.2.1 Depressão	22
1.4.2.2 Prejuízos de Memória.....	23
1.5 TRATAMENTO	24
2. GLUTAMATO NA DOENÇA DE PARKINSON	25
2.1 ANTAGONISTAS DE RECEPTOR NMDA	26
1.2 Cetamina.....	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 ANIMAIS	31
3.2 DROGAS.....	32
3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	32
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	34
3.4.1 Teste de Preferência por Sacarose	34
3.4.2 Teste de Natação Forçada Modificada	35
3.4.3 Teste de Reconhecimento Social	35
3.4.4 Teste de Campo Aberto	36
3.4.5 Teste de Vocalização Ultrassônica.....	36
3.4.6 Análise Automatizada da Marcha (Sistema de Catwalk)	38
3.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA DA TIROSINA HIDROXILASE (TH).....	39
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	41
4.1. 1ª Coorte de Ratos: <i>Experimento 1: Caracterização do Comportamento Tipo Depressivo em Modelo animal de 6-OHDA, Tratamento Crônico com Cetamina e Testes Comportamentais (depressão, memória e motor).</i>	41
4.2 Teste de Preferência por Sacarose	41
4.3 Natação Forçada Modificada	43
4.4 Teste de Reconhecimento Social.....	45
4.5 Teste de Campo Aberto.....	45
4.6 Imunohistoquímica de Tirosina Hidroxilase (TH)	46
4.7. 2ª Coorte de ratos: <i>Experimento 2: Indução do Comportamento tipo Depressivo, Teste de Vocalização Ultrassônica e Avaliação da Marcha por Catwalk</i>	48
4.8 Preferência por Sacarose.....	48
4.9 Vocalização Ultrassônica de 50kHz.....	50
4.10 Teste de Catwalk para Avaliação da Marcha.....	53
4.11 Correlações entre preferência de sacarose, número de chamadas e alterações motoras (teste Catwalk) em ratos com lesão bilateral de SNc	54
5. DISCUSSÃO.....	57
5.1 1ª Coorte de Ratos (<i>Experimento 1</i>).....	57
5.2. 2ª Coorte de Ratos (<i>Experimento 2</i>).....	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa crônica e progressiva, relacionada à idade. É a segunda em número de casos no mundo, ficando atrás apenas da Doença de Alzheimer (DA) (ONU, 2014). Acomete em torno de 1% das pessoas acima de 65 anos e em torno de 4-5% das pessoas acima de 85 anos (Zangerl *et al.*, 2009; Aarsland *et al.*, 2012; Lee e Gilbert, 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a expectativa de vida mundial vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Dados recentes indicam que do ano 2000 até o ano de 2015 houve um aumento de 5 anos na expectativa de vida média da população (OMS, 2016). No Brasil a situação é semelhante. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) afirma que no ano de 2015, a expectativa de vida do brasileiro foi de 75.5 anos, enquanto que, em 2011, era de 74.3 anos (IBGE, 2016).

Portanto, fica clara a relação entre o envelhecimento acentuado e maior a taxa de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Estima-se que o número de doentes irá dobrar nas duas próximas décadas, de modo que o conhecimento sobre as patologias, bem como sobre métodos de prevenção e tratamento, tornem-se cada vez mais necessários (Sharma *et al.*, 2013).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

A DP se caracteriza por morte de neurônios dopaminérgicos pigmentados, localizados na Substância Negra *pars compacta* (SNpc) lateral e ventral do mesencéfalo, bem como, pela degeneração das terminações nervosas do estriado dorsal (caudado e putamen). Isso culmina com redução significativa do conteúdo de dopamina nigral e também nos núcleos da base, regiões responsáveis principalmente pelo controle motor do organismo bem como, controle de memórias (Jankovic, 2008; Bartels e Leenders, 2009; Vecchia *et al.*, 2015).

Outro marcador importante da DP encontrado *post mortem* é o corpúsculo de Lewy, que pode ser encontrado no Sistema Nervoso Central, Periférico e Autônomo. Esses corpúsculos são caracterizados por inclusões citoplasmáticas eosinofílicas, compostas por agregados proteicos como α -sinucleína, ubiquitina, parkina e neurofilamentos. Todavia, ainda não se sabe precisamente como são formados, qual é a relação com a patogênese e neurodegeneração da DP (Spillantini *et al.*, 1997; Jellinger, 2012).

1.3 ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

Embora se conheçam as características fisiopatológicas da DP, muitas são as suposições a respeito de sua etiologia, porém, acredita-se que essa perda resulte de uma combinação de fatores ambientais, genéticos e fisiológicos. Com relação aos fatores ambientais, tem se notado que a exposição frequente a herbicidas e pesticidas está relacionada com o desenvolvimento da doença. Também tem sido relatado que a exposição crônica a metais pesados, como chumbo, manganês e cobre está relacionada ao aparecimento de sintomas típicos da DP (Gorell *et al.*, 2004; Hancock *et al.*, 2008).

Estudos de longa data fazem referência a hereditariedade da DP, uma vez que pode ser passada de geração em geração. Curiosamente, esse fato acontece com uma parcela reduzida de pacientes (Abeliovich e Gitler, 2016). Mesmo que não manifestem a doença, existe a chamada predisposição para o seu desenvolvimento e requer acompanhamento constante. Isso foi explicado por possíveis alterações genéticas que podem ocorrer com 10 genes diferentes já elucidados, condicionando a DP como uma doença de herança autossômica dominante e recessiva (Abeliovich e Gitler, 2016; Abid Sheikh *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016).

Por outro lado, sabe-se também que o estresse oxidativo, a excitotoxicidade e a neuroinflamação têm papel fundamental na neurodegeneração. A respiração mitocondrial gera, por si só, uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, gerando o chamado estresse oxidativo, que intensifica a morte de neurônios. O próprio envelhecimento parece acentuar esse processo e, na DP, ele se torna ainda mais evidente. A ativação da micróglia pode

ocorrer devido a esse processo de morte neuronal produzido pelo estresse oxidativo. Para tal, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios produzidos nas células da glia, que aumentam a neurotoxicidade e influenciam na neurodegeneração (Mosley *et al.*, 2006; Subramaniam e Chesselet, 2013; Santiago *et al.*, 2015).

A excitotoxicidade ocorre devido ao excesso de glutamato no meio extracelular, que promove a ativação constante de seus receptores, principalmente dos receptores de N-metil D-aspartato (NMDA), desencadeando um processo neurotóxico. Sabe-se hoje que essa superatividade está relacionada ao desenvolvimento de uma série de patologias, entre elas, as doenças neurodegenerativas (Stahl, 2006; Stoll *et al.*, 2007).

Nesses casos, a neurotransmissão excitatória passaria a ocorrer de modo desenfreado levando à morte neuronal, alterando a excitabilidade da membrana e promovendo a ativação excessiva de enzimas intracelulares capazes de disparar uma cascata química destrutiva (Stahl, 2006; Stoll *et al.*, 2007).

Portanto, acredita-se que a DP é uma doença multifatorial e não é possível supor qual dos fatores tem mais importância em sua etiologia.

1.3.1 Modelos Animais da Doença de Parkinson

É sabido que existe envolvimento de toxinas ambientais na patogênese da DP. Um estudo descobriu que a administração da substância 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), substância extremamente lipofílica, leva ao aparecimento de sintomas parkinsonianos pela neurodegeneração nigroestriatal (Langston e Ballard, 1983). Desde então, diversas toxinas têm sido utilizadas sistematicamente para mimetizar a DP em modelos animais, principalmente em roedores.

Essas toxinas podem ser administradas intraperitonealmente (IP) (rotenona, MPTP) ou intracerebralmente (MPTP, 6- hidroxidopamina – 6-OHDA) em várias regiões (SNpc, feixe prosencefálico medial, estriado) e, dependendo da concentração utilizada, causam maior ou menor perda neuronal; Além disso, as

mesmas podem reproduzir modelos iniciais ou mais avançados da DP (Ferro *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006; Drui *et al.*, 2013; Tadaiesky *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2010, 2015).

A 6-OHDA produz lesões pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), além de ser tóxica para o complexo I mitocondrial (Meredith *et al.*, 2008; Iachininoto *et al.*, 2013). A 6-OHDA também pode induzir a ativação da micróglia, que, quando ativada, promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios (p.ex. NF-κB, IL-1, IL-6, COX-2) responsáveis pela produção de radicais livres e posterior morte neuronal (Miller *et al.*, 2009; Iachininoto *et al.*, 2013; Santiago *et al.*, 2015).

Por esses motivos, acredita-se que a 6-OHDA seja um bom modelo animal da Doença de Parkinson para gerar neurodegeneração dopaminérgica, semelhante à perda neuronal em humanos, bem como, é capaz de desenvolver os sintomas motores e não motores da doença.

1. 4 SINTOMAS

1.4.1 *Sintomas Motores da Doença de Parkinson*

Os sintomas mais evidentes da DP, e necessários para seu correto diagnóstico, são os chamados sintomas motores. Como já citado, uma das principais características fisiopatológicas da doença é a morte de neurônios dopaminérgicos no estriado. Essa região é responsável por iniciar e coordenar os movimentos corporais e uma redução dos níveis de dopamina prejudica esse processo, gerando os sintomas motores da doença (Jankovic, 2008; Wickremaratchi *et al.*, 2011; Aarsland *et al.*, 2012). Esses se tornam evidentes quando existe em torno de 60-70% de morte neuronal (Wickremaratchi *et al.*, 2011; Sharman, *et al.* 2013;).

Os sintomas mais frequentes são o tremor de repouso unilateral, a bradicinesia, rigidez muscular, instabilidade postural, alterações na marcha e alterações de voz (Lees e Revesz, 2009; Belvisi *et al.*, 2016; Karunanayaka *et al.*, 2016).

1.4.1.1 Alterações Vocais

Dentre os sintomas motores, as alterações vocais muitas vezes passam despercebidas. Todavia, acometem em torno de 90% dos pacientes com DP. Geralmente são acompanhadas de dificuldade de deglutição, que ocorre em decorrência de modificações da musculatura da laringe, modulada pela dopamina da via nigroestriatal (Ciucci *et al.*, 2007; Kalf *et al.*, 2011; Walsh e Smith, 2012).

Essas modificações de fala, que incluem dificuldade de elaboração de frases e na manutenção do tom de voz, são também chamadas de disfonias ou disartrias (disartia hipocinética). São classificadas por movimentos lentos, fracos, imprecisos ou descoordenados da musculatura envolvida na produção da fala, devido a transtornos na execução motora que envolve múltiplas áreas do encéfalo, incluindo os núcleos da base (Spencer e Rogers, 2005; Ciucci *et al.*, 2007). Essas alterações de fala costumam preceder os sinais motores clássicos e têm sido consideradas por especialistas como biomarcadores para o diagnóstico da doença (Sung *et al.*, 2010; Postuma *et al.*, 2012).

Também é possível detectar alterações vocais em animais. Estudos mostraram que a injeção unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial induziu alterações vocais em ratos, observadas através do teste de vocalização ultrassônica (USV) (Ciucci *et al.*, 2007, 2008, 2009, 2011; Kelm-Nelson, *et al.* 2016).

Roedores são animais altamente sociáveis, apresentando vários tipos de comportamentos sociais, se comunicando por meio da emissão de distintos tipos de vocalizações ultrassônicas (USV). Estas USV servem como sinais afetivos, dependentes da situação, e são úteis como marcadores sensíveis para determinar os déficits sociais (Wöhr e Schwarting, 2008; Wöhr *et al.*, 2011; Wöhr e Schwarting, 2012). Essas vocalizações variam em complexidade de suas formas de ondas, sendo mais frequentes as de 22 kHz (vocalizações aversivas), 40 kHz (vocalizações emitidas por filhotes, geralmente quando separados da mãe) e de 50 kHz (vocalizações positivas ou apetitivas) (Brudzynski, 2005; Wöhr *et al.*, 2008). As vocalizações de 50 kHz são emitidas

em situações ditas apetitivas e se subdividem em tipo simples (flat) e complexas ou frequência modulada (trill, step ou mixed) (Wöhr *et al.*, 2011; Wöhr e Schwarting, 2012).

Estas vocalizações são uteis para estudar os déficits fonéticos associados à DP, à medida que se assemelham a comunicação vocal humana (Ciucci *et al.*, 2007, 2009; Riede *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que a infusão unilateral de 6-OHDA foi suficiente para alterar parâmetros acústicos de 50 kHz (largura de banda reduzida, intensidade e frequência de pico) (Ciucci *et al.*, 2008, 2009; Kelm-Nelson, *et al.* 2016). Da mesma forma, a administração intraperitoneal de haloperidol e outros antagonistas de receptores de dopamina (D₁ e D₂) levam à alteração da transmissão dopaminérgica, mudando todo o perfil de emissão de USV de 50 kHz (Ciucci *et al.*, 2007; 2009; Ringel *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013).

Juntos, esses estudos sugerem que as USVs de 50 kHz de ratos são modificadas após a infusão de 6-OHDA, moduladas em algum grau pelo sistema dopaminérgico.

1.4.2 Sintomas Não Motores da Doença de Parkinson

Geralmente, a DP é uma doença de avanço lento, sendo que a morte de neurônios ocorre gradativamente por um longo período de tempo (Aarsland *et al.*, 2012). É sabido que existe um período pré-clínico, onde o processo patológico já está acontecendo, porém, sem desenvolver os sintomas motores necessários para o diagnóstico. Nesse período, costumam-se observar alguns dos chamados sintomas não motores da doença (Svenningsson *et al.*, 2012). Esses sintomas podem preceder os sintomas motores em muitos anos e englobam: depressão, prejuízo de memória, disfunção olfativa, alterações de sono, alterações no Trato Gastrointestinal (TGI), entre outros (Chaudhuri e Schapira, 2009; Lima, Martins, *et al.*, 2012; Aarsland *et al.*, 2012; Svenningsson *et al.*, 2012; Munhoz *et al.*, 2015).

Sabe-se que a degeneração nigroestriatal e redução da quantidade de dopamina são responsáveis pelo desenvolvimento e agravamento dos sinais motores; já os sinais não motores, que podem ser igualmente debilitantes para

os pacientes, ainda não estão claros quanto aos mecanismos que os originam (Póstuma *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013; Antonelli e Strafella, 2014).

1.4.2.1 Depressão

A Depressão Maior (DM) é o distúrbio psiquiátrico não motor mais frequentemente associado à Doença de Parkinson, afetando quase 35% dos pacientes (Aarsland *et al.*, 2012). De acordo com Althaus *et al.* (2008), em cerca de 25% dos pacientes com DP a depressão antecede os sintomas motores, demonstrando uma associação positiva entre depressão e subsequente risco da DP. De acordo com estudos anteriores, a depressão também pode agravar a evolução da DP (Kanda *et al.*, 2008; Corod-Artal *et al.*, 2008; Frisina *et al.*, 2009). Em estudo realizado por Riedel *et al.* (2010), demonstrou-se que a presença de depressão em pacientes com DP reduz o grau de independência, refletindo na piora da qualidade de vida dos pacientes.

O comprometimento da neurotransmissão da dopamina é tido como uma das causas da depressão associada à DP, porém, além do déficit de dopamina, outros neurotransmissores também estão reduzidos, como a serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NA). Portanto, a hipótese da redução das aminas cerebrais, associada à hipótese psicogênica como consequência das limitações motoras, são as mais aceitas na tentativa de esclarecer a fisiopatologia da depressão na DP (Kanda *et al.*, 2008; Currier e Nemeroff, 2010; Politis *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2015). Outros estudos mostram que também são observadas alterações na transmissão de acetilcolina e glutamato (Aarsland *et al.*, 2012; Lindgren and Dunnett, 2012; Santiago *et al.*, 2015).

A perda de energia e interesse, anedonia, dificuldade de tomar decisões, sentimento de tristeza, desamparo e distúrbio de sono REM são alguns dos sintomas decorrentes da DM mais comumente observados. Vários desses sintomas também se desenvolvem na depressão associada ao Parkinson. Muitas vezes, torna-se difícil diagnosticar essa depressão, uma vez que alguns dos sintomas podem ser mascarados pelos próprios sintomas da DP (Mayeux *et al.*, 1986; Brown e Maccarthy, 1990; Leentjens *et al.*, 2003; Farabaugh *et al.*, 2009; Politis *et al.*, 2012; Torbey *et al.*, 2015).

O comportamento tipo depressivo foi identificado em modelos animais da DP, gerados por toxinas (Schintu *et al.*, 2012). Em modelos de ratos com administração cerebral de neurotoxinas de 6-OHDA, MPTP ou rotenona, observou-se comportamento de tipo depressivo no teste de natação forçada (Druil *et al.*, 2013; Tadaiesky *et al.*, 2008, 2010; Santiago *et al.*, 2010, 2015); no teste de preferência de consumo de sacarose (Tadaiesky *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2010, 2015), desamparo aprendido (Winter *et al.*, 2007) e também no teste de suspensão da cauda (Mori *et al.*, 2005).

1.4.2.2 Prejuízos de Memória

As deficiências de memória também são comuns em pacientes com DP, sendo que quadros de demência ocorrem em torno de 15% a 40% dos pacientes. Diferente da depressão, a perda de memória não antecede os sintomas motores. Costuma se desenvolver e se agravar conforme a evolução da doença (Chaudhuri *et al.*, 2006; Svenningsson *et al.*, 2012). O comprometimento da memória observado na DP geralmente acomete a memória de trabalho, memória implícita, memória episódica e aprendizagem processual (Lindgren e Dunnett, 2012; Solari *et al.*, 2013).

Essas deficiências de memória têm sido relacionadas aos déficits na transmissão dopaminérgica, mas também parecem ter associações com prejuízos de outros neurotransmissores, como serotonina, acetilcolina e glutamato (Lindgren e Dunnett, 2012; Svenningsson *et al.*, 2012).

O padrão dessa perda de memória sugere que na DP existe um déficit na recuperação ou no acesso à informação e não um problema na sua codificação ou armazenamento, como é comum na DA. Esse aspecto se deve, provavelmente, à disfunção executiva causada pelas lesões no estriado (Pillon *et al.*, 2001). Entretanto, estudos recentes sugerem que há também atrofia no hipocampo, e esta seria uma das responsáveis pelo declínio cognitivo em quadros mais avançados da doença (Apostolova *et al.*, 2012; Cohn *et al.*, 2016).

Vários estudos pré-clínicos com lesão nigral ou estriatal decorrente de neurotoxinas (p. Ex., 6-OHDA e MPTP) mostraram comprometimento em

tarefas relacionadas à memória, como na esQUIVA ativa (Da Cunha *et al.*, 2001; Gevaerd *et al.*, 2001), esQUIVA inibitória (Schwartz e Carey, 1985), labirinto aquático de Morris (Miyoshi *et al.*, 2002; Da Cunha *et al.*, 2003; Belissimo *et al.*, 2004; Ferro *et al.*, 2005, 2007), labirinto em T (Ho *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2012), reconhecimento de novos objetos (Hsieh *et al.*, 2012) e memória social (Tadayeisky *et al.*, 2008).

1.5 TRATAMENTO

Alguns medicamentos estão disponíveis na clínica para tratar os sintomas da DP, entre eles, podemos citar a Levodopa (L-DOPA), agonistas dopaminérgicos como o pramipexol, inibidores da enzima catecol-orto-metil-transferase (COMT), inibidores da monoamino oxidase B (IMAO-B) e também a amantadina (Laurencin *et al.*, 2016).

Esses fármacos apresentam eficácia clínica para tratar os sintomas motores da doença, porém apenas os agonistas dopaminérgicos parecem ter certa atividade nos sintomas não motores (Laurencin *et al.*, 2016). Isso provavelmente se deve aos mecanismos de ação, que visam a melhorar apenas a transmissão dopaminérgica e não as demais vias envolvidas com a etiologia da depressão. Da mesma forma, fármacos antidepressivos como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e antidepressivos tricíclicos nem sempre apresentam eficácia terapêutica satisfatória. Outra limitação diz respeito ao tempo para que seja iniciada a redução dos sinais clínicos, que pode levar de 2 a 6 semanas a partir do início do tratamento (Aarsland *et al.*, 2012).

Em decorrência desses fatores, muitos estudos têm surgido no intuito de propor novas estratégias terapêuticas. Uma das linhas de pesquisa aponta o sistema glutamatérgico como novo alvo de ação de fármacos para o tratamento da depressão. O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), tem sido associado à DP assim como aos transtornos do humor (Starr *et al.*, 1997; Zarate *et al.*, 2002; Schintu *et al.*, 2012; Duman *et al.*, 2012, 2014).

2. GLUTAMATO NA DOENÇA DE PARKINSON

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central em mamíferos, e possui ações na excitabilidade e na plasticidade sináptica em muitos circuitos cerebrais (Witkin *et al.*, 2007).

Possui ação pré e pós-sináptica, se ligando a receptores específicos que são encontrados na membrana de neurônios e células gliais. Esses receptores podem ser classificados em ionotrópicos (ativação rápida) e metabotrópicos (ativação lenta). O grupo ionotrópico inclui o NMDA (N-metil-D-aspartato), o AMPA (α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e a família dos receptores do tipo cainato. Os receptores AMPA são canais iônicos permeáveis e seletivos ao Na^+ , enquanto os receptores do tipo NMDA são canais iônicos, permeáveis principalmente ao Ca^{2+} . Ambos promovem a despolarização da membrana citoplasmática (Mathew *et al.*, 2005).

O excesso de glutamato no meio extracelular promove a ativação constante destes receptores, principalmente dos receptores de NMDA, desencadeando um processo de neurotoxicidade, estando assim relacionado com doenças neurológicas de natureza aguda, como isquemia cerebral e epilepsia, ou processos neuropsiquiátricos degenerativos de evolução crônica, como esclerose lateral amiotrófica, coreia de Huntington, Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer (Meldrum, 2000; Zarate *et al.*, 2002).

A excitotoxicidade é a principal hipótese para explicar o mecanismo neuropatológico que mediará a via final comum de vários transtornos neuropsiquiátricos de curso degenerativo. Sob tal circunstância, o processo normal de neurotransmissão excitatória passaria a ocorrer de modo desenfreado, levando à morte neuronal, alterando a excitabilidade da membrana e promovendo a ativação excessiva de enzimas intracelulares capazes de disparar uma cascata química destrutiva (Stahl, 2006).

2.1 ANTAGONISTAS DE RECEPTOR NMDA

Especificamente, o receptor de NMDA desempenha importantes funções fisiológicas e está presente nas membranas pós-sinápticas. Em fases iniciais do desenvolvimento, este receptor parece estar envolvido na determinação de morte ou sobrevivência de neurônios, enquanto que, durante a fase adulta, está envolvido na plasticidade sináptica, aprendizado, consolidação da memória, transmissão sensorial, coordenação, entre outras funções. Quando estimulados pelo glutamato, os receptores de AMPA se tornam permeáveis aos íons sódio e potássio, enquanto os receptores NMDA são permeáveis ao sódio, cálcio e potássio. O cálcio é importante para que ocorra uma série de eventos celulares, porém, em grandes concentrações, leva à morte neuronal por necrose (Tickhonova *et al*, 2002, Marinelli *et al*, 2007, Stoll *et al*, 2007).

O receptor de NMDA é ativado pela ligação simultânea do glutamato (ou de um agonista glutamatérgico) ao sítio do glutamato e de um co-agonista ao sítio da glicina, provocando assim uma mudança conformacional e a consequente abertura do canal. Além disso, ocorre a liberação de um íon magnésio, que em potenciais normais de repouso bloqueia esse canal, impedindo a passagem de outros íons. Quando a membrana é despolarizada, o que normalmente ocorre após a ativação do receptor de AMPA na mesma sinapse ou em sinapse vizinha, o íon magnésio é liberado, permitindo a passagem de corrente pelo canal do receptor de NMDA. Desta forma, o receptor de NMDA, além de ser um canal iônico dependente de ligante, é também dependente de voltagem (Bear *et al*, 2002; Paoletti e Neyton, 2007).

Outra característica do receptor de NMDA é ser um hetero-oligômero formado por diferentes combinações das subunidades NR1, NR2 e NR3, sendo que apenas os receptores que apresentam as subunidades NR1 e NR2 são funcionais. A subunidade NR1 apresenta oito isoformas formadas pelo splicing alternativo de um único gene; a subunidade NR2 apresenta quatro subtipos (NR2A-D), e a NR3 apresenta dois (NR3A e B) (Curtis *et al*, 2003, Paoletti e Neyton, 2007).

O receptor de NMDA tem ampla distribuição no sistema nervoso central, sendo as subunidades deste receptor expressas em diferentes regiões: NR2A é expressa em todo o cérebro, NR2B é encontrada no córtex cerebral, hipocampo e bulbo olfatório, NR2C no cerebelo e NR2D no mesencéfalo. A medula espinhal expressa ainda níveis elevados de NR2C e D (Tolle *et al.*, 2003).

Antagonistas do receptor NMDA de glutamato têm se tornado cada vez mais alvo de pesquisas farmacológicas, principalmente para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Jenner, 2003). Esses receptores também são expressos no neurônio espinhoso médio do estriado, e acredita-se que a hiperatividade desencadeada pelo glutamato pode contribuir com o processo neurodegenerativo. Acredita-se que o bloqueio destes receptores leve a uma redução da excitotoxicidade do glutamato nessa região, reduzindo a morte neuronal (Starr *et al.*, 1997; Zarate *et al.*, 2002; Jenner, 2003; Schintu *et al.*, 2012).

Nesta linha, a dizolcipina (MK-801) e a cetamina, ambos antagonistas dos receptores NMDA, foram eficazes em modelos animais para tratar os sintomas motores de DP (Carlsson e Carlsson, 1989; Starr *et al.*, 1997; Kelsey *et al.*, 2004). Da mesma forma, a memantina, um antagonista parcial de receptores de NMDA, apresentou resultados mistos no comprometimento cognitivo em ensaios clínicos de PD (Svenningsson *et al.*, 2012).

Em paralelo, sabe-se que pacientes com depressão maior apresentam alterações morfológicas que indicam perda ou atrofia celular decorrentes da elevada estimulação do sistema glutamatérgico (Zarate *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que os antagonistas de receptor NMDA também atuam nesse sentido, apresentando atividade antidepressiva, com início do efeito mais rápido que os antidepressivos convencionais (Zarate *et al.*, 2002; Aan Het Rot *et al.*, 2012; Duman, 2012, 2014; Pilc *et al.*, 2013; Naughton *et al.*, 2014).

1.2 Cetamina

A cetamina, antagonista de receptores NMDA, é utilizada clinicamente como anestésica. Em baixas doses (subanestésicas), tem se mostrado eficaz para tratar depressão em humanos e também o comportamento tipo depressivo em modelos animais, principalmente quando há refratariedade aos demais tratamentos (Li *et al.*, 2010; Jett *et al.*, 2015; Zanos *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016). Além disso, sua atividade é rápida, iniciando-se logo após a primeira administração e se mantendo por vários dias. (Duman, 2012, 2014; Pilc *et al.*, 2013; Naughton *et al.*, 2014).

Normalmente, a cetamina é administrada clinicamente por via intravenosa (IV), porém pode ser utilizada via intramuscular (IM), oral e retal. A via IV ainda é a mais aceita, pois apresenta um início de ação rápido além de possibilitar a administração da menor dose possível, reduzindo o aparecimento de efeitos colaterais (Carr *et al.*, 2004; Murrough *et al.*, 2010; Glue *et al.*, 2010).

Mathew e colaboradores (2001) demonstraram que o uso de cetamina IV reduz os sintomas depressivos em casos de depressão maior que não responde ao tratamento convencional, de maneira rápida, diferindo dos antidepressivos convencionais que levam semanas para desenvolver a ação terapêutica. Porém, o efeito da cetamina é transitório, tendo um pico máximo de ação após 24 horas de administração que pode, ou não, ser mantido por algumas semanas.

De acordo com Duman e colaboradores (2012), em casos de estresse e depressão, existe atrofia de neurônios e redução das espinhas dendríticas nos neurônios do sistema límbico, inclusive no córtex pré-frontal e hipocampo. Após 24 horas da administração da primeira dose de cetamina em baixas doses, além da regulação da atividade glutamatérgica, ocorre nítido aumento da sinaptogênese das espinhas dendríticas.

Além disso, na DM existe redução dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A cetamina não apenas bloqueia os receptores de glutamato de NMDA, mas também pode modular essa molécula, aumentando os seus níveis (Garcia *et al.*, 2008, Jet *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2016). O BDNF

é um regulador chave da proteína alvo na sinalização da rapamicina mamária (mTOR) e da plasticidade sináptica, estimulando a maturação das espinhas dendríticas, síntese protéica e transmissão sináptica. Esses seriam alguns dos mecanismos propostos para explicar a atividade antidepressiva.

Consistente com a rápida indução de sinaptogênese, também se observou que a cetamina produziu efeitos antidepressivos rápidos em vários modelos comportamentais. Houve diminuição de imobilidade no teste de natação forçada, diminuição do tempo para escapar do desamparo aprendido e latência reduzida para se alimentar (Li *et al*, 2010).

Com base em todos os dados apresentamos, a hipótese do presente trabalho é de que a cetamina pode apresentar atividade antidepressiva em modelo animal de 6-OHDA e, além disso, observar possíveis ações terapêuticas no prejuízo de memória social, alterações da marcha e alterações vocais desses ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da cetamina no comportamento tipo depressivo, prejuízo de memória, alterações vocais e motoras no modelo animal de 6-OHDA em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir o comportamento tipo depressivo em ratos após a injeção de 6-OHDA, e avaliação através do teste de preferência por sacarose;
- Observar a atividade antidepressiva da cetamina nos testes de natação forçada e preferência por sacarose;
- Identificar prejuízos de memória social através do teste de reconhecimento social;
- Identificar alterações vocais no modelo animal de 6-OHDA através do teste de vocalização ultrassônica;
- Identificar alterações motoras no modelo animal de 6-OHDA através do teste de campo aberto e catwalk (marcha do animal);
- Avaliar o efeito da cetamina e da imipramina nos testes citados acima;
- Realizar a imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) da SNpc.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, de aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 280 a 320 g no início dos experimentos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram mantidos 5 animais por caixa padrão de polipropileno durante os experimentos, em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de claro-escuro de 12 horas (7-19h). A água e a comida foram fornecidas à vontade durante todo o estudo. Também foram utilizados ratos Wistar jovens (com um mês de idade) para realização do teste de reconhecimento social. Os animais foram divididos de acordo com os testes realizados.

Os animais foram separados aleatoriamente, em grupos diferentes de acordo com a necessidade de cada experimento. No Experimento 1, os animais foram subdivididos nos grupos 6-OHDA (n=49) e SHAM (n=50) após a cirurgia, para realização do teste de preferência por sacarose. Na sequência, foram mais uma vez separados de acordo com o tratamento (veículo, 5mg/kg, 10mg/kg e 15mg/kg cetamina e 20mg/kg imipramina), totalizando 9-11 animais por grupo.

Da mesma forma, no experimento 2 os animais foram separados de acordo com a lesão em 6-OHDA (n=24) e SHAM (n=25). Após a preferência por sacarose, vocalização ultrassônica e catwalk após a cirurgia, foram subdivididos nos grupos de acordo com o tratamento (veículo, 5mg/kg, 10mg/kg e 15mg/kg cetamina e 20mg/kg imipramina), totalizando 4-6 animais por grupo.

Todos os experimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, protocolo 786. Todo esforço possível foi empreendido para minimizar os desconfortos causados aos animais.

3.2 DROGAS

- 6-OHDA (6 µg/µL, dissolvida em líquido cefalorraquidiano (LCR) + 0,2% ácido ascórbico. Injeção de 1 µL, taxa de infusão: 0,33 µL/ min. Sigma Chemical Co., EUA) – Neurotoxina;
- Imipramina (20 mg/kg, IP, dissolvido em salina 0,9%. Henrifarma, São Paulo, Brasil) - Antidepressivo tricíclico;
- Cetamina (5,10 ou 15 mg/kg, IP, dissolvida em salina 0,9%. Mistura racêmica, Quetamina, Vetnil, Louveira-SP, Brasil).
- Pentabiótico Pequeno Porte (1mg/kg, IM, Zoetis, São Paulo, Brasil)
- Lidocaína 2% (0,1 mL, injeção sob a pele que recobre o crânio. Hipolabor, Minas Gerais, Brasil).

As doses utilizadas foram baseadas em estudos anteriores, que descrevem os efeitos neurotóxicos da 6-OHDA (FERRO *et al.*, 2005, LIMA *et al.*, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2010, 2015), antidepressivos da cetamina (uma vez por semana) (Yang *et al.*, 2013) e da imipramina (diariamente) (SANTIAGO *et al.*, 2015).

Primeiramente, foi realizado um piloto para determinar como seria feita a administração do veículo: diariamente ou uma vez por semana. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os dois grupos nos testes realizados. Por esse motivo, foi determinada a administração de veículo uma única vez na semana.

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Foi administrado 15 minutos antes da cirurgia pentabiótico de uso veterinário, na dose de 1mg/kg por via intramuscular (IM). O Pentabiótico é composto por: Benzilpenicilina benzatina 3.000.000UI, Benzilpenicilina procaína 1.500.000UI, Benzilpenicilina potássica 1.500.000UI, Diidroestreptomicina base (sulfato) 1.250 mg e Estreptomicina base (sulfato) 1.250 mg. Essa combinação de antibióticos tem por finalidade ampliar o

espectro bacteriano e evitar o aparecimento de infecções decorrentes do procedimento cirúrgico.

Para a lesão na via nigroestriatal, os animais foram anestesiados com Equitesin® (45,7 ml água destilada; 4,25g hidrato de cloral; 2,13g de sulfato de magnésio; 11,5 ml de álcool; 0,972g tiopental e 42,8 ml propilenoglicol - 0,3mg/Kg, i.p.) e devidamente tricotomizados. Em seguida, foram colocados no equipamento estereotáxico. Álcool Iodado foi utilizado para fazer a antissepsia da região do crânio, sendo que em seguida aplicou-se anestésico local (lidocaína 2% - 0,1 mL) via subcutânea (SC) logo abaixo da pele que recobre o crânio dos ratos.

Com auxílio de bisturi, a pele e a fáscia muscular que recobrem o crânio dos animais foram afastadas, o bregma (intersecção anterior das suturas cranianas) foi localizado e utilizado como ponto de referência para encontrar as coordenadas da Substância Negra *pars compacta*: ântero posterior (AP): - 5,0 mm a partir do bregma; médio lateral (ML): $\pm 2,1$ mm a partir da linha média e dorso ventral (DV): - 8,0 mm a partir da calota craniana segundo Paxinos e Watson (2005).

Utilizando uma broca de baixa rotação, foram feitas perfurações bilaterais nos crânios, onde foi realizada a infusão da 6-OHDA com uma agulha (27 gauge) conectada a uma seringa de 10 μ L (Hamilton, EUA), injeção de 1 μ L, taxa de infusão: 0,33 μ L/ min, durante 3 minutos. Para evitar refluxo, a agulha foi mantida no local da infusão por 2 minutos após o término do procedimento. Os animais do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, porém receberam LCR+0,2% de ácido ascórbico. Ao final da cirurgia, foi administrado bicarbonato de sódio IP (fármaco básico), para acelerar a excreção do tiopental (fármaco ácido) e evitar possíveis problemas cardiorrespiratórios no animal após a cirurgia.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Teste de Preferência por Sacarose

O teste de preferência por sacarose (TPS) é frequentemente usado como medida de anedonia em roedores (Tadaiesky *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2010; Martynhak *et al.*, 2011) e tem suma importância em estudos pré-clínicos de depressão relacionada à DP, uma vez que não é influenciado por alterações motoras (Schintu *et al.*, 2012). Os animais foram isolados em caixas moradias com acesso livre aos alimentos, uma semana antes da cirurgia. Para cada rato foram disponibilizadas duas garrafas com água da torneira, colocadas em lados extremos da grade da caixa, durante 24 horas. Esse processo é realizado com o objetivo de adaptar os ratos a presença de duas garrafas, de modo que bebam de ambas, indiscriminadamente (fase de treino).

Após 24 horas, uma das garrafas foi substituída por outra garrafa contendo solução de sacarose a 1% por 24h (habituação à fase de sacarose). Em seguida, realizou-se o teste basal (um período de 24h com duas garrafas: uma com água e outra com 1% de solução de sacarose). A quantidade de líquido consumida foi calculada pelo peso inicial menos o peso final das garrafas. A soma do consumo de água e do consumo de sacarose foi definida como o consumo total de líquidos e a preferência foi calculada como a porcentagem do volume de ingestão de sacarose sobre o volume total de ingestão de líquidos (Martynhak *et al.*, 2011).

Antes da cirurgia, o teste basal foi realizado para selecionar os ratos que apresentassem preferência pela sacarose, sendo que os animais com menos de 70% de preferência por sacarose foram excluídos do estudo (8 animais no total). Após a cirurgia, este teste foi realizado uma vez por semana para acompanhar o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo. Observou-se que após 3 semanas, os ratos lesados com 6-OHDA apresentaram comportamento de tipo depressivo. Depois disso, os ratos receberam tratamento com os fármacos (começando um dia antes deste teste) e o teste de preferência de sacarose foi repetido semanalmente durante 4 semanas. Esse mesmo protocolo foi repetido para os 2 experimentos que serão descritos na sequência (figura 2 e 8).

3.4.2 Teste de Natação Forçada Modificada

O teste de natação forçada modificada (TNFM) é o teste mais utilizado para avaliar comportamentos depressivos, incluindo os relacionados à DP (Schintu *et al.*, 2012). O teste de natação forçada foi realizado 28 dias após o início da administração dos fármacos (56 após a cirurgia), através de sua versão modificada (figura 2) (Consoni *et al.*, 2006; Slattery e Cryan, 2012). Os ratos foram colocados individualmente num cilindro opaco (40 cm de altura e 20 cm de diâmetro) contendo água (profundidade de água de 30 cm, $25 \pm 1^\circ$ C). Foram realizadas duas sessões de natação: uma sessão de pré-teste inicial de 15 minutos, e 24h depois, por uma sessão de teste de 5 minutos. Utilizou-se a técnica de amostragem de comportamento: foi registrado o comportamento predominante (imobilidade, escalada ou natação) em cada período de 5s do teste de 300s totais. Foi atribuído o comportamento de imobilidade quando não foi observada qualquer atividade adicional à necessária para manter a cabeça do rato acima da água. O comportamento de escalada consistiu em movimentos das patas dianteiras dirigidos para cima das ao longo da lateral do cilindro de natação. O comportamento de natação foi definido como movimento (geralmente horizontal) por toda a extensão do cilindro natação, que muitas vezes incluiu cruzamento para outro quadrante (imaginando a área circular do cilindro dividida em 4 partes) (Slattery e Cryan, 2012).

3.4.3 Teste de Reconhecimento Social

O teste de reconhecimento social (TRS) é utilizado para avaliar a memória social de curto prazo de ratos (Dantzer *et al.*; 1987, Prediger *et al.*, 2004; Tadaiesky *et al.*, 2008). Os mesmos ratos testados no teste de preferência de sacarose foram mantidos isolados e foram utilizados para este teste após 21 dias de tratamento (49 dias após a cirurgia) (figura 2). O teste de reconhecimento social consistiu em duas sessões sucessivas de 5 min, separadas por um intervalo de 30 min. Durante a primeira apresentação, foi colocado um rato jovem (um mês de idade) na caixa moradia do rato adulto, e registou-se o tempo gasto pelo rato adulto a investigar (cheirar, perseguir,

montar) o rato jovem. Finalizando a primeira apresentação, o rato juvenil foi removido da caixa do rato adulto e mantido isolado em outra caixa durante o período de espera. Após um intervalo de 30 min, o rato jovem foi re-exposto ao rato adulto e foi registado novamente o tempo de investigação. O princípio deste modelo é que usando um curto intervalo de tempo (menos de 40 min) entre as duas apresentações, o rato adulto reconhece o rato juvenil que foi previamente exposto, reduzindo o tempo de investigação durante a segunda apresentação. O resultado do teste foi expresso como a razão entre a segunda exposição e a primeira exposição (Ratio of Investigation Duration - RID): um RID mais baixo reflete em uma diminuição na investigação durante a segunda exposição, demonstrando a capacidade de reconhecimento do rato adulto. Esta transformação foi escolhida a fim de equalizar variações entre diferentes animais (Prediger *et al.*, 2004).

3.4.4 Teste de Campo Aberto

O aparato do teste de campo aberto (TCA) consiste em uma arena circular (97 cm de diâmetro, 32,5 cm de altura) pintada de branco e dividida em 19 quadrantes de tamanho aproximadamente igual. A intensidade da luz dentro do campo aberto foi ~ 100 lx. Os ratos foram gentilmente colocados no centro do aparelho e ficaram livres para explorar livremente a área durante 5 min. Dois parâmetros foram avaliados durante este teste: o número de quadrantes cruzados e a frequência de levantar. O campo aberto foi limpo com solução alcoólica a 5% antes de cada análise, para eliminar um possível viés devido aos odores deixados pelos ratos anteriores. Este teste foi realizado em três momentos diferentes (Fig. 2): 7 dias após a cirurgia, 35 dias após a cirurgia (7 dias após o início do tratamento com os fármacos) e 56 dias após a cirurgia (28 dias após o início do tratamento com os fármacos).

3.4.5 Teste de Vocalização Ultrassônica

As USV foram registradas por intermédio de microfone (UltraSoundGate Microphones, CM 16, Bioacoustic Avisoft) colocado a 20 cm de distância da caixa de teste (caixa moradia limpa – caixa padrão de polipropileno) a uma

altura de 45 cm acima do piso da caixa onde o animal foi mantido. Para realizar o teste, os ratos foram previamente habituados em sala com luz baixa durante meia hora. Em seguida, os ratos foram transferidos para a sala de teste, mantidos em caixa limpa, individualizados, contendo cepilho fresco, também utilizando luz baixa. O teste foi realizado durante a fase clara do animal, sempre das 8 as 12 horas (manhã). As medições foram obtidas em três momentos. Em primeiro lugar foi realizado o screening (teste basal), antes da cirurgia, durante 5 minutos por dois dias, sempre realizado no mesmo período do dia (Fig. 3). O screening é realizado porque os ratos apresentam uma grande variabilidade interindividual na emissão de USVs de 50 kHz. Após a cirurgia (15 dias) o teste foi repetido da mesma maneira. No final do tratamento (21 dias após o início do tratamento), o teste foi novamente realizado (Fig. 3). Os dados acústicos foram gravados pelo programa Avisoft Recorder (versão 2.7, Avisoft Bioacoustic), e para a análise acústica, as gravações foram transferidas para o software SAS Lab Pro (versão 4.38, Bioacoustic Avisoft) e posteriormente, as USVs de 50kHz foram analisadas e classificadas.

A classificação foi feita de acordo com as frequências de pico e a forma de cada vocalização. As USVs de 50kHz podem ser divididas em simples e frequência modulada (FM) (fig 1). O tipo simples também pode ser chamado de chamada “flat”. Esta USV foi classificada quando as alterações de frequência de pico dentro de um único elemento de chamada eram iguais ou inferiores a 5 kHz. No entanto, a diferença entre os picos inicial e final pode ser maior do que 5 kHz, então, USVs com uma forma flat direcionadas para cima ou para baixo também foram consideradas chamadas flat. Outros tipos de USVs são chamadas de frequência modulada e divididas em: “trill”, “step” e “mixed”. Trills: uma única vocalização, com um deslocamento de frequência de pico maior que 5 kHz ou com duas ou mais mudanças de frequência de pico em direções opostas com pelo menos 5 kHz de distância (onduladas ou em zig zag). Step: é chamada step quando uma USV flat curta é sobreposta no início ou no final de outra USV flat normal, onde existe um pequeno intervalo entre elas. É necessário que uma dessas step curta tenha 5 kHz a mais do que a flat normal. Mixed: é também chamada de “frequência modulada” e não se encaixa nas categorias anteriores de step e trill, portanto, trata-se de uma mistura,

consistindo de pelo menos 2 tipos de chamadas (trill e flat ou flat e step) (Pereira *et al.*, 2014; Wendler *et al.*, 2016).

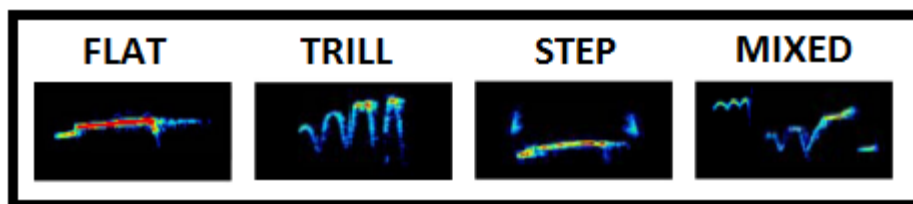


Figura 1: tipos de USVs (PEREIRA et al., 2014 - modificada).

3.4.6 Análise Automatizada da Marcha (Sistema de Catwalk)

Este teste visa avaliar a marcha dos animais (Chuang *et al.*, 2010). Os ratos foram submetidos à avaliação motora através do sistema de análise automatizada da marcha CatWalk (Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda). O aparelho é construído por uma longa placa de vidro, iluminada com luz verde fluorescente irradiada para o chão da passarela de vidro de um dos lados. Em um ambiente escuro, a luz é refletida para baixo e as pegadas do rato, à medida que percorre a passarela, são registradas por uma câmera localizada sob o vidro. Essa análise foi realizada em três momentos: 3 dias antes da cirurgia, para a adaptação do rato ao aparelho, 8 dias após a cirurgia e 22 dias após o início do tratamento (Fig. 3). O teste foi considerado finalizado quando o rato completou 3 corridas (atravessando a passarela de um lado para o outro).

Os resultados foram analisados pelo software CatWalk XT 10.5. Os seguintes parâmetros de marcha que foram examinados: tempo de duração da corrida (tempo total para atravessar a passarela), Stand (duração do contato de uma pata com a placa de vidro), área de contato máxima (área máxima de uma pata que entra em contato com a plataforma de vidro); Print length (comprimento (direção horizontal) da impressão completa); Step cycle (tempo em segundos entre dois contatos iniciais, consecutivos da mesma pata); Duty Cycle (expressa o Stand em porcentagem do Step Cycle); Swing (tempo entre colocações sucessivas da mesma pata); Terminal Dual Stance (o segundo passo do step cycle que a pata traseira contralateral faz contato com a plataforma).

3.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA DA TIROSINA HIDROXILASE (TH)

Para o estudo histológico e imuno-histoquímico, no final de 28 dias de tratamento com fármaco (dia 56 da lesão SNpc, Fig. 2) os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral e perfundidos intracardialmente com solução salina, seguidos por uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em 0,1 M, pH 7,4. Foram decapitados por guilhotina e em seguida, os cérebros foram colocados em solução de sacarose a 30% por cerca de 48 horas, até deixarem de flutuar. Posteriormente, os cérebros foram armazenados num freezer (-80° C). Para análise, foram cortados com o auxílio de criostato a -20°C. De cada cérebro foram cortadas 12 secções de 40 µm de espessura no plano coronal para cobrir aproximadamente 180 µm (-4,92 a -5,28 de bregma) do cérebro central (Paxinos e Watson, 2005) e colocadas em eppendorfs contendo uma substância anti-congelante. As secções de tecido foram incubadas com anticorpo primário anti-TH produzido em camundongo e diluídas em PBS contendo 0,3% de Triton X-100 (1: 500; cat # AB152 Chemicon, Temecula, CA, EUA) durante a noite à temperatura ambiente. As fatias foram então incubadas com o anticorpo secundário conjugado com biotina (1: 200, cat # S-1000 Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 2h em temperatura ambiente. Após várias lavagens em PBS, o complexo de anticorpo foi detectado utilizando uma modificação do sistema ABC (cat # PK6101, kit Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories), seguido por reação com 3,3'-diaminobenzidina. Os cortes foram então colocados em lâminas gelatinizadas para melhor aderência. Os mesmos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, fixadas em xilol e cobertas. Depois, as lamínulas recobriram cada lâmina com Entellan. Os neurônios TH-imunorreativos (TH-ir) foram quantificados utilizando o software ImageJ (Fiji 1.46r, Bethesda, Maryland, USA). O número médio de neurônios TH-ir em cada hemisfério, obtido através da quantificação de 6 fatias alternadas, foi considerado representativo das células neuronais SNc em cada animal. As áreas selecionadas foram digitalizadas com uma câmera digital DP71 de um microscópio BX51 Olympus (Olympus Optical Co, Japão).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram previamente testados para avaliar homogeneidade e normalidade, de modo a assegurar que os dados estivessem de acordo com os critérios para a realização de análise de variância (ANOVA). Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados por ANOVA de uma, duas ou três vias, seguidas pelo teste post-hoc de Newman-Keuls (para ANOVA de duas e três vias, somente quando a interação com todos os fatores $p < 0,05$). Os resultados do catwalk foram analisados quanto ao efeito da lesão na SNpc utilizando uma ANOVA bidirecional com tempo (antes e após cirurgia) e lesão (SHAM x 6-OHDA); Para avaliar os efeitos do tratamento, uma ANOVA de 2 vias com lesão (SHAM x 6-OHDA) e o tratamento como fatores (apenas parâmetros que são significativamente afetados pela lesão foram incluídos nesta análise). O teste de preferência de sacarose também é analisado por ANOVA de duas vias (tempo de lesão X) antes do tratamento e ANOVA de três vias (tratamento de lesão X tempo X) para o período de tratamento. As correlações entre preferência de sacarose, número de chamadas de 50 kHz e parâmetros de CatWalk foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Os ratos utilizados nesse estudo foram separados em dois grandes experimentos, sendo, portanto, submetidos a diferentes testes em cada um deles. O processo cirúrgico foi o mesmo para todos os animais, bem como o tempo necessário para o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo (21 dias após a cirurgia), para subsequente início do tratamento. Para facilitar o entendimento, os experimentos serão apresentados na sequência, sendo denominados 1ª Coorte de Ratos e 2ª Coorte de ratos (figuras 2 e 8).

4.1. 1ª Coorte de Ratos: Experimento 1: Caracterização do Comportamento Tipo Depressivo em Modelo animal de 6-OHDA, Tratamento Crônico com Cetamina e Testes Comportamentais (depressão, memória e motor).

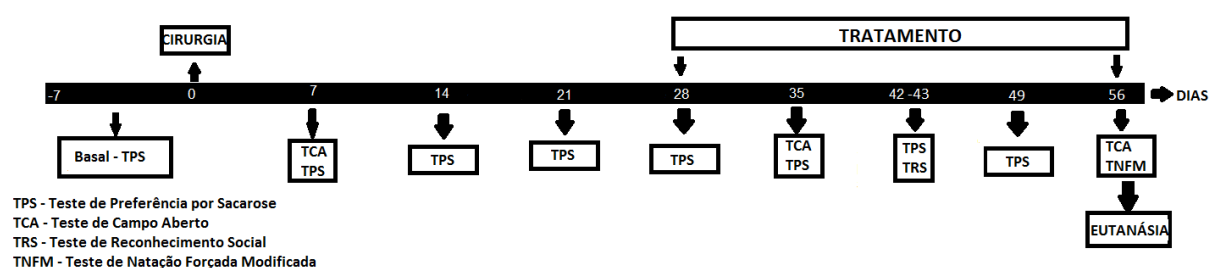


Figura 2: Representação esquemática do experimento 1: Indução do comportamento tipo depressivo e testes comportamentais. Depois da cirurgia 6-OHDA n=49 e SHAM n=50. Depois dos tratamentos n=9-11 por grupo.

Em um primeiro momento, a indução do comportamento tipo depressivo foi avaliada semanalmente em animais lesados bilateralmente na SNpc com a neurotoxina 6-OHDA em diferentes tempos. Depois que o comportamento estava instalado (21 dias após a cirurgia), o tratamento com as drogas foi iniciado e os testes comportamentais foram realizados.

4.2 Teste de Preferência por Sacarose

Foi previamente realizado um teste basal (antes da cirurgia) com o objetivo de selecionar os animais que apresentassem preferência por sacarose superior a 70%. Assim, 8 animais foram excluídos do experimento. Os demais animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica (dia 0) e divididos em 2

grandes grupos (6-OHDA n=49 ratos e SHAM n=50 ratos). Após esse período, semanalmente (7º, 14º e 21º dia pós-cirúrgico), foram submetidos ao teste de preferência por sacarose, para detectar a presença do comportamento tipo depressivo. Esse esquema foi mantido até a terceira semana após a cirurgia, até obter a confirmação da instalação do comportamento tipo-depressivo nos animais (figura 3).

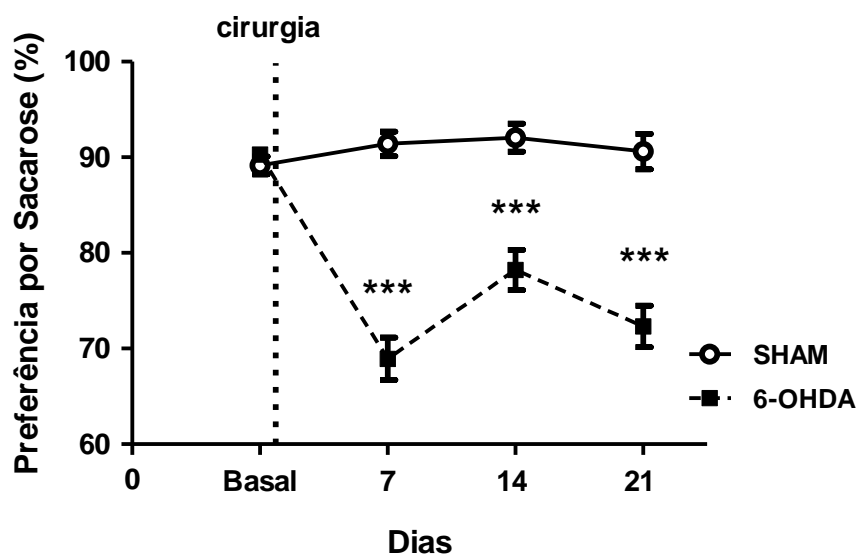


Figura 3: Efeito da lesão nigral bilateral no teste de preferência de sacarose antes do tratamento com drogas. Teste Basal (antes da cirurgia), 7, 14 e 21 dias após lesão bilateral de SNpc com 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Os dados representam a média \pm EPM; Grupo 6-OHDA: 49 ratos; Grupo SHAM: 50 ratos. *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo SHAM no mesmo tempo.

Após o início do tratamento com os fármacos, houve aumento na preferência de sacarose em ratos lesionados e tratados com cetamina (5, 10 e 15 mg / kg) quando comparados com ratos lesionados e tratados com veículo em todos os pontos de tempo (todos $p < 0,001$), como pode ser visto na figura 4. A imipramina mostrou os resultados semelhantes.

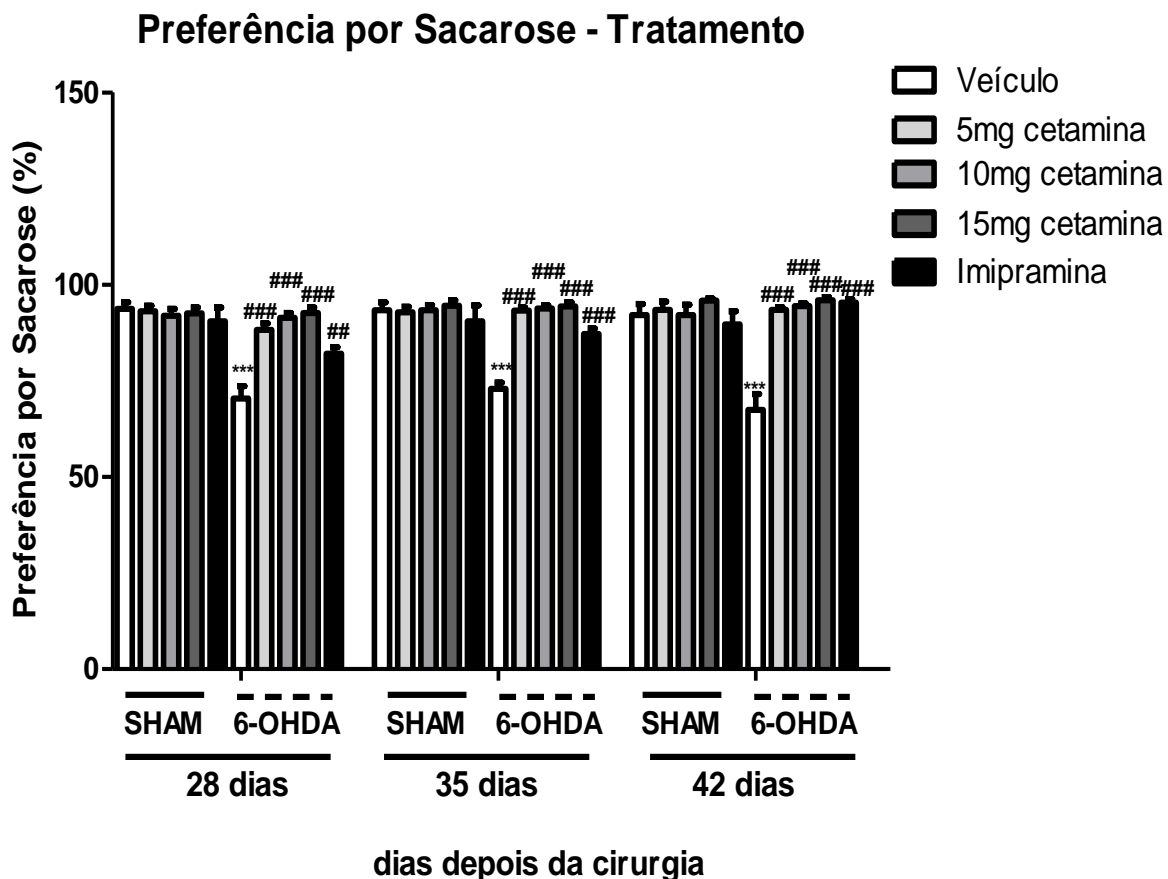


Figura 4: Efeito do tratamento farmacológico no Teste de Preferência de Sacarose de ratos com lesão de substância negra pars compacta (SNpc). Os grupos SHAM e 6-OHDA foram tratados com cetamina (5, 10 ou 15 mg / kg, IP, uma vez por semana), imipramina (20 mg / kg, IP, diariamente) ou veículo (IP, uma vez por semana). Pontos de tempo: 7, 14 e 21 dias de tratamento (28, 35 e 42 dias após lesão bilateral SNc, respectivamente). *** $P < 0,001$ em comparação com o grupo SHAM no mesmo ponto de tempo, ### $p \leq 0,001$ e ## $p \leq 0,01$ em comparação com o grupo 6-OHDA + veículo no mesmo ponto de tempo.

4.3 Natação Forçada Modificada

Os ratos 6-OHDA+veículo apresentaram maior frequência de imobilidade quando comparados com o grupo SHAM+ veículo ($p < 0,001$). Os ratos 6-OHDA tratados com 5, 10 e 15 mg / kg de cetamina mostraram uma redução na frequência de imobilidade quando comparados com o grupo 6-OHDA+ veículo (todos $p < 0,01$, Fig. 5A). A imipramina também reverteu o aumento na frequência do parâmetro imobilidade ($p < 0,01$) nos ratos lesionados, como esperado. Os ratos com lesão 6-OHDA tratados com veículo reduziram a frequência de natação quando comparados com o grupo veículo

SHAM+veículo ($p < 0,01$). Os ratos tratados com cetamina (todas as doses) e imipramina tiveram uma frequência de natação significativamente aumentada quando comparados com o 6-OHDA + veículo (todos $p < 0,05$, figura 5B). Em relação à frequência de escalada, observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo 6-OHDA + 15 mg/kg de cetamina e o grupo 6-OHDA+veículo ($p < 0,01$, figura 5C). O mesmo foi observado com o grupo tratado com imipramina ($p < 0,01$).

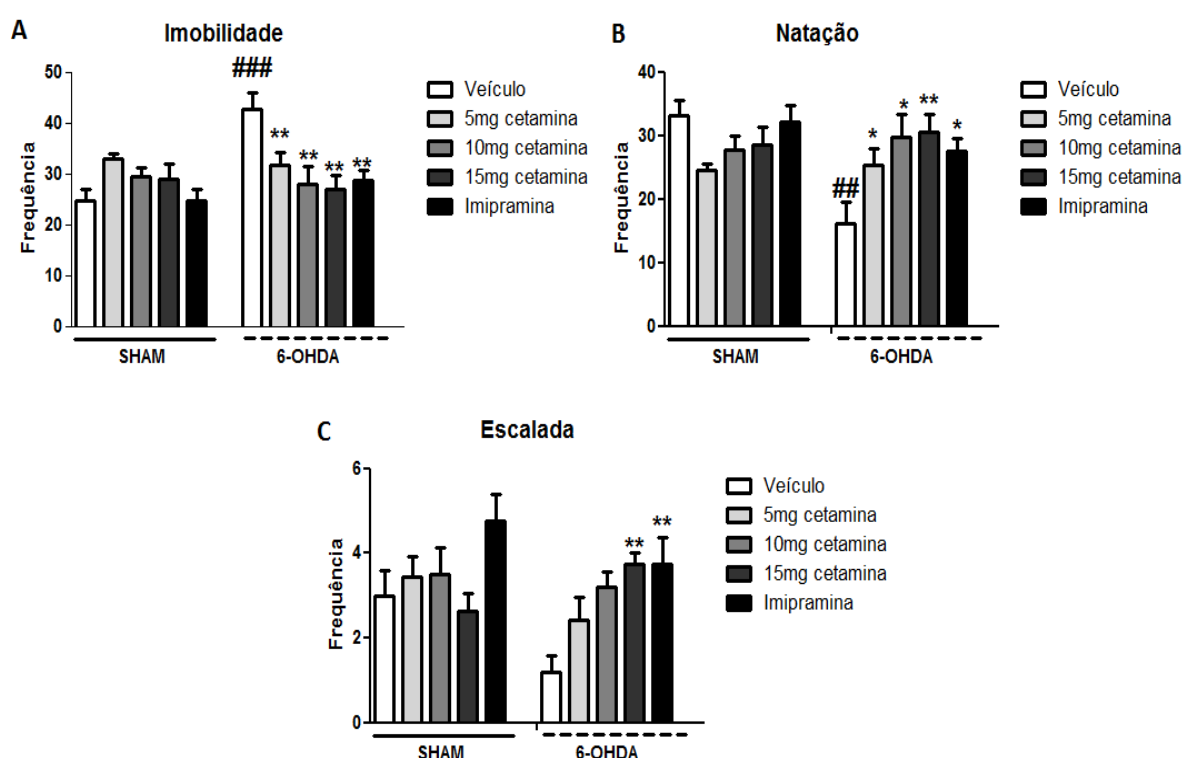


Figura 5: Efeito do tratamento farmacológico no teste de natação forçada modificada em ratos lesados com 6-OHDA. Os grupos SHAM e 6-OHDA foram tratados com cetamina (5, 10 ou 15 mg/kg, IP, uma vez por semana), Imipramina (20mg/kg, IP, diariamente) ou veículo (IP, uma vez por semana) durante 28 dias (56 dias após a lesão) (A) Frequência de imobilidade (B) Frequência de natação; (C) Frequência de escalada. Os dados representam a média + EPM, $n = 9-11/\text{grupo}$. ## $p \leq 0,01$ e ### $p < 0,001$ em comparação com o grupo SHAM+Veículo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo 6-OHDA+veículo.

4.4 Teste de Reconhecimento Social

A figura 6 ilustra os efeitos do tratamento com cetamina e imipramina no teste de reconhecimento social. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo, indicando que o grupo 6-OHDA+veículo mostrou um RID maior que o grupo SHAM+veículo ($p < 0,001$). Os grupos 6-OHDA tratados com cetamina (todas as doses) e imipramina melhoram o RID quando comparados com o grupo 6-OHDA+veículo (todos $p < 0,001$).

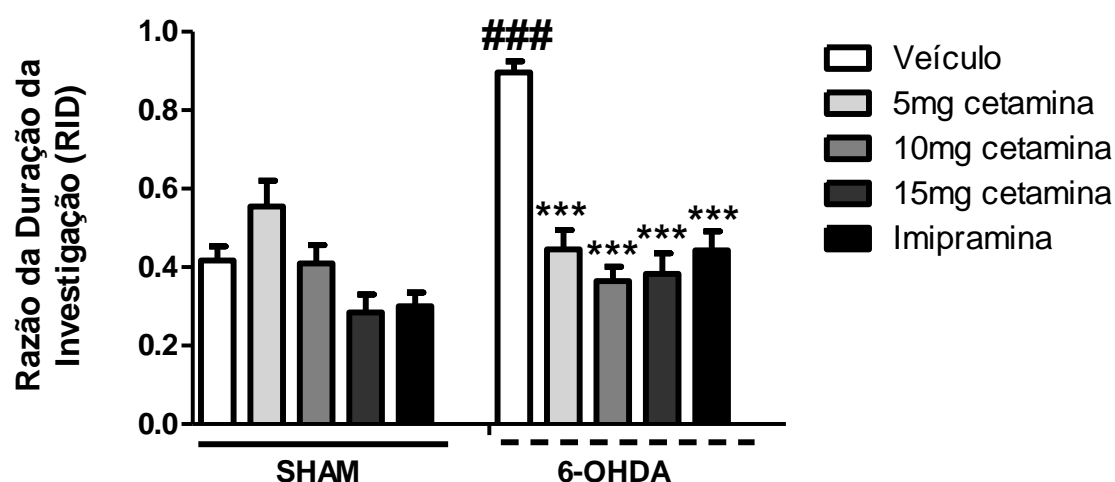


Figura 6: Efeito do tratamento farmacológico no Teste de Reconhecimento Social em ratos com lesão bilateral da substância negra *pars compacta* (SNpc). Os grupos SHAM e 6-OHDA foram tratados com cetamina (5, 10 ou 15 mg/kg, IP, uma vez por semana), imipramina (20mg/kg, IP por dia) ou veículo (IP, uma vez por semana) durante 21-22 Dias (42-43 dias após lesão bilateral SNpc). Os dados representam a média + EPM da Razão da Duração da Investigação (RID): relação entre o primeiro e segundo tempo de investigação do mesmo rato; N = 9-11/grupo. #### $p \leq 0,001$ em comparação com o grupo SHAM+veículo, *** $p \leq 0,001$ em comparação com o grupo 6-OHDA+veículo.

4.5 Teste de Campo Aberto

O teste de campo aberto foi realizado em três momentos: 7 dias após a cirurgia, 35 dias após a cirurgia (7 dias após o início do tratamento) e 56 dias após a cirurgia (28 dias após o início do tratamento). Em nenhum momento foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, conforme a tabela 1.

Tabela 1: Efeito da cetamina e imipramina no teste de campo aberto em ratos com lesão bilateral de Substantia negra *pars compacta* induzida por 6-OHDA.

Grupo	Momento de teste (dia) ¹	Quadrantes Cruzados ²	Frequência de levantar ²
SHAM + Veículo	7	99±5	15±2
	35	86±8	10±1
	56	74±8	8±1
SHAM + 5mg/kg cetamina	7	96±4	13±1
	35	86±4	10±1
	56	78±4	11±2
SHAM + 10mg/kg cetamina	7	100±9	15±2
	35	91±8	15±3
	56	94±12	15±2
SHAM + 15mg/kg cetamina	7	99±9	13±2
	35	93±7	11±2
	56	99±9	12±1
SHAM + Imipramina	7	95±9	13±2
	35	83±7	12±2
	56	69±9	8±2
6-OHDA + Veículo	7	90±7	13±1
	35	88±5	14±3
	56	76±9	11±1
6-OHDA + 5mg/kg cetamina	7	85±8	12±2
	35	95±7	9.9±1
	56	91±4	15±2
6-OHDA + 10mg/kg cetamina	7	84±7	11±2
	35	97±12	11±2
	56	82±9	10±2
6-OHDA + 15mg/kg cetamina	7	95±4	13±1
	35	98±10	9±1
	56	86±7	10±2
6-OHDA + Imipramina	7	102±4	12±1
	35	83±7	8±1
	56	70±8	9±1

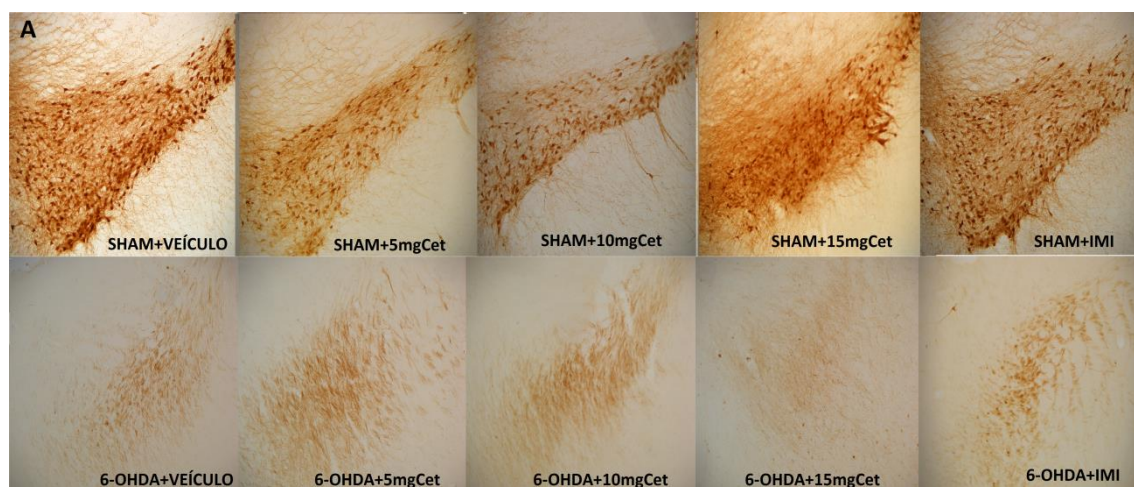
¹ Dias após o início do tratamento (7, 28 e 56 dias de lesão SNc, respectivamente)

² dados expressos como média ± EPM (n = 9-11 / grupo), p>0.05.

4.6 Imunohistoquímica de Tirosina Hidroxilase (TH)

A imunohistoquímica de tirosina-hidroxilase (TH) foi realizada no final do experimento. Como pode ser observado na figura 7, houve uma redução estatisticamente significativa na porcentagem da população de neurônios imunoreativos para TH em animais do grupo 6-OHDA+veículo (15%) quando comparados com animais do grupo SHAM+veículo (100%). A cetamina (todas

as doses) e a imipramina não afetaram a porcentagem de neurônios imunoreativos de TH em ratos lesionados com 6-OHDA ou no grupo SHAM.



B

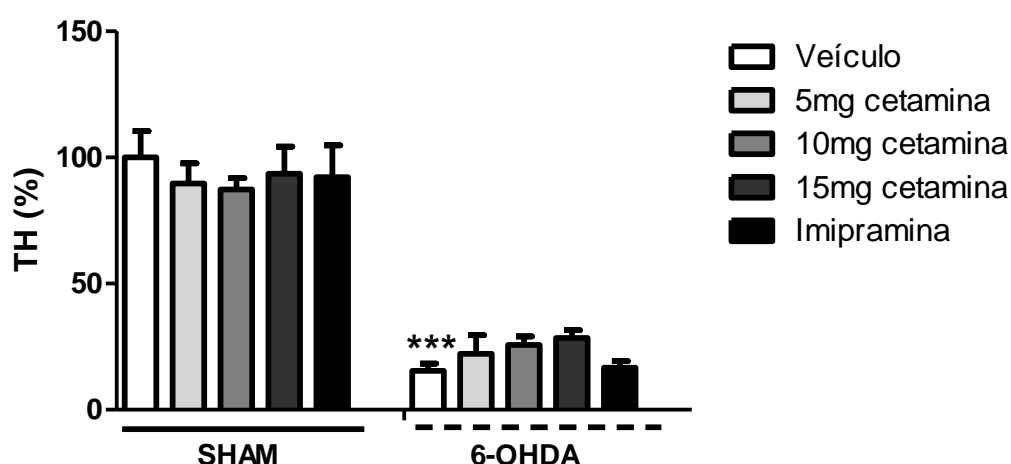


Figura 7: Efeito do tratamento farmacológico em neurônios da substância negra *pars compacta* (SNpc) com Tirosina Hidroxilase (TH), em ratos com lesão de 6-OHDA e SHAM. Os grupos SHAM e 6-OHDA foram tratados com cetamina (5, 10 ou 15 mg/kg, IP, uma vez por semana), imipramina (20 mg/kg, IP, diariamente) ou veículo (IP, uma vez por semana) durante 28 dias (56 dias após lesão bilateral). (A) Cortes corados de cada grupo (B) % de TH de cada grupo. Os dados representam a média + EPM da % da densidade TH total no SNpc (os dados são expressos como uma porcentagem do grupo de controle), n = 4/ grupo. *** p < 0,001, em comparação com o grupo SHAM + veículo.

4.7. 2ª Coorte de ratos: Experimento 2: Indução do Comportamento tipo Depressivo, Teste de Vocalização Ultrassônica e Avaliação da Marcha por Catwalk

Primeiramente, os ratos passaram por um teste basal de preferência por sacarose para exclusão daqueles que apresentavam menos de 70% de preferência. Em seguida, foram submetidos à vocalização ultrassônica (screening) para delimitar o perfil de vocalização de cada rato. Esse método foi realizado por dois dias consecutivos, durante 5 minutos. Na sequência, foram submetidos ao teste de Catwalk, para adaptação. Depois disso, foram distribuídos aleatoriamente para lesão com 6-OHDA (dia 0) ou para o grupo SHAM. O teste de preferência de sacarose foi repetido semanalmente até ao dia 42 (21 dias de tratamento com os fármacos). A USV foi repetida 15 dias depois da cirurgia e 21 dias após o início do tratamento (49 dias após a cirurgia) e o Catwalk, 8 dias após a cirurgia e 22 dias após o início do tratamento (50 dias após a cirurgia) (figura 8).

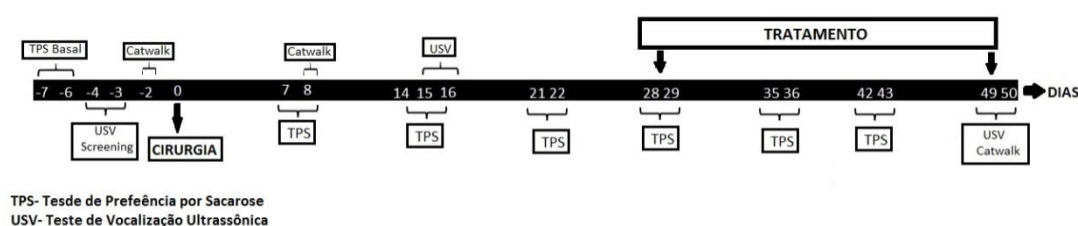


Figura 8: Representação esquemática do experimento 2: Indução do comportamento tipo depressivo, vocalização ultrassônica e Catwalk. Depois da cirurgia 6-OHDA n=24 e SHAM n=25. Depois dos tratamentos n=4-6 por grupo.

4.8 Preferência por Sacarose

Da mesma forma demonstrada no Experimento 1, o TPS foi realizado com um grupo diferente de animais, com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo e, concomitantemente, o perfil de vocalização ultrassônica e Catwalk desses animais. Como pode ser visto na figura 9, a mensuração da preferência por sacarose foi realizada durante 3 semanas, até que o comportamento tipo depressivo dos animais

lesionados com 6-OHDA estivesse bem estabelecido. Esses dados reproduzem os dados obtidos no primeiro experimento.

Após a cirurgia, os ratos 6-OHDA reduziram a preferência por sacarose ao 7º, 14º e 21º dias após a cirurgia quando comparados com ratos SHAM (todos $p < 0,001$).

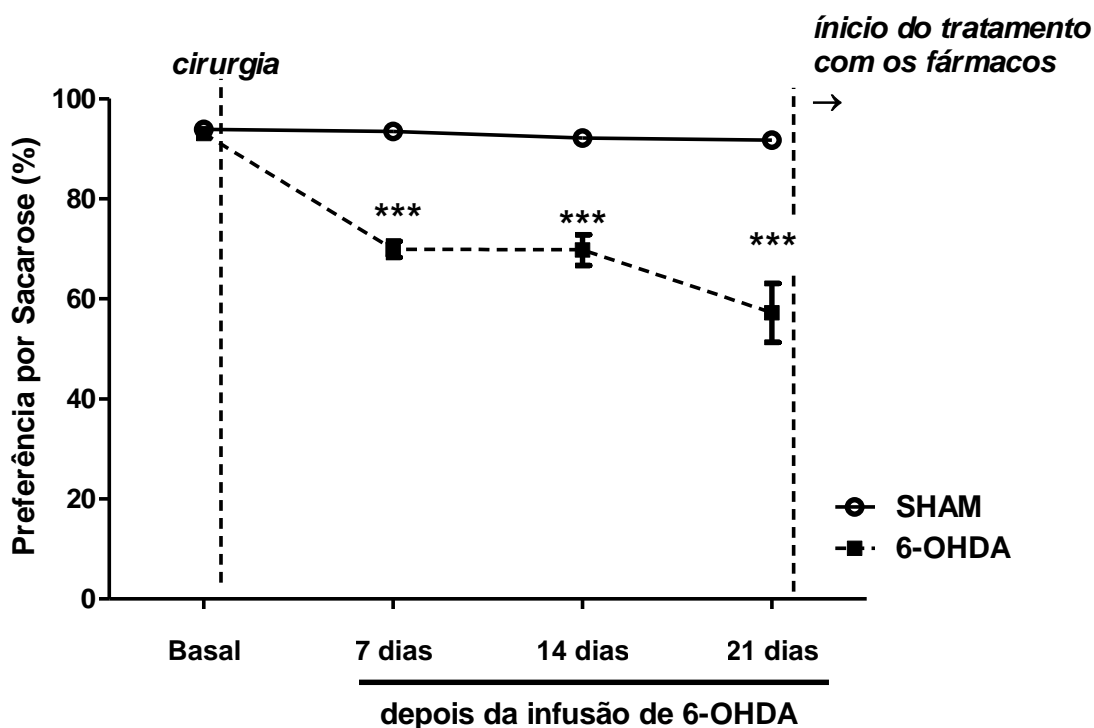


Figura 9: Efeito da lesão bilateral com 6-OHDA da SNpc no teste de preferência de sacarose antes do tratamento farmacológico. Basal (antes da cirurgia), 7, 14 e 21 dias após lesão bilateral 6-OHDA. Os dados representam a média \pm EPM; Grupo 6-OHDA: 24 ratos; Grupo SHAM: 25 ratos. *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo SHAM no mesmo ponto de tempo.

Da mesma forma, os animais foram tratados com cetamina (5, 10 e 15 mg/kg) a partir do dia 28 após a cirurgia (figura 10). Esse tratamento, mantido até o dia 50 após a cirurgia, novamente reverteu o comportamento tipo depressivo dos grupos tratados, quando comparados ao grupo 6-OHDA+veículo (cetamina 5 mg/kg $p < 0,01$ e cetamina 10 e 15 mg/kg $p < 0,001$). A imipramina apresentou resultados semelhantes.

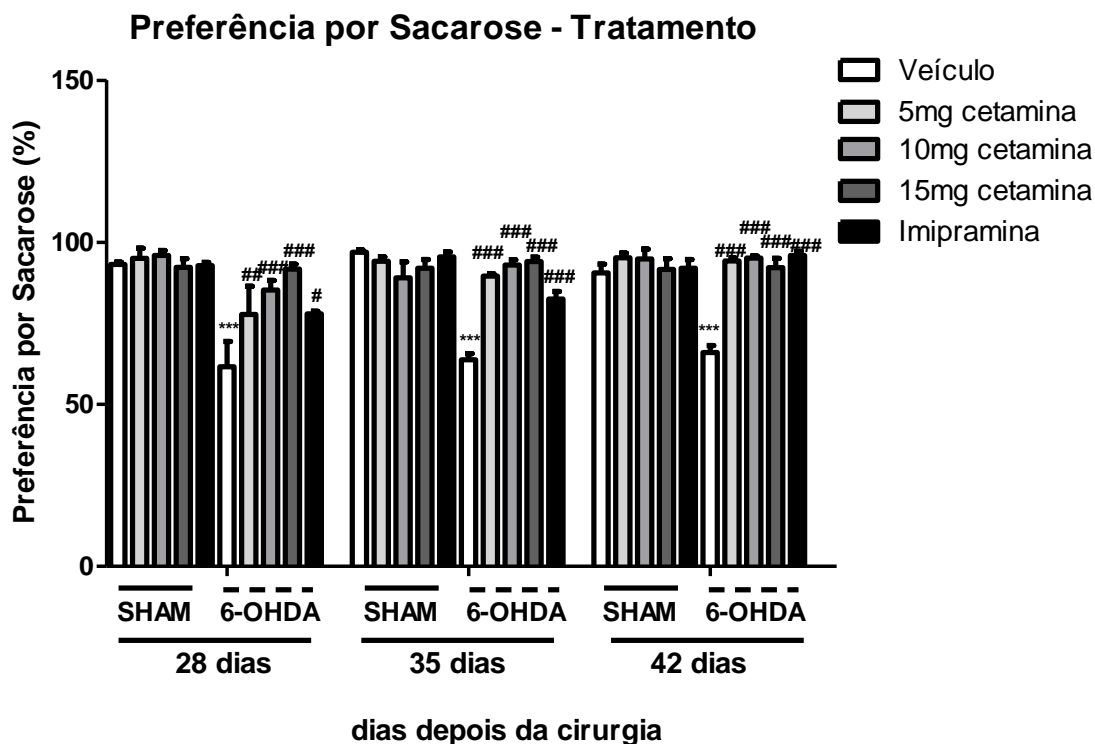


Figura 10: Efeito do tratamento farmacológico no Teste de Preferência de Sacarose de ratos lesados com 6-OHDA bilateralmente na SNpc. Os grupos SHAM e 6-OHDA foram tratados com cetamina (5, 10 ou 15 mg/kg, IP, uma vez por semana), imipramina (20 mg/kg, IP, diariamente) ou veículo (IP, uma vez por semana). Pontos de tempo: 7, 14 e 21 dias de tratamento (28, 35 e 42 dias após lesão bilateral da SNpc, respectivamente). *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo SHAM no mesmo ponto de tempo, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ em comparação com o grupo 6-OHDA + veículo no mesmo ponto de tempo.

4.9 Vocalização Ultrassônica de 50 kHz

A figura 11 ilustra os parâmetros de USV de 50 kHz analisados. O número de USVs antes e depois da cirurgia é representado na figura 11A. O grupo 6-OHDA mostrou redução significativa no número de USVs quando comparado aos animais SHAM $p < 0,001$.

Outros parâmetros relacionados também foram alterados. A duração de cada USV do grupo 6-OHDA foi mais curta, quando comparada com o grupo SHAM $p < 0,001$ (figura 11B). Da mesma forma, o número total de USVs foi reduzido no grupo 6-OHDA, como mostrado na figura 11C, $p < 0,001$. Latência refere-se ao tempo que o animal leva para começar a vocalizar. Neste

experimento, os animais 6-OHDA demoraram mais para iniciar as chamadas, quando comparados com os animais SHAM $p < 0,05$ (figura 11D).

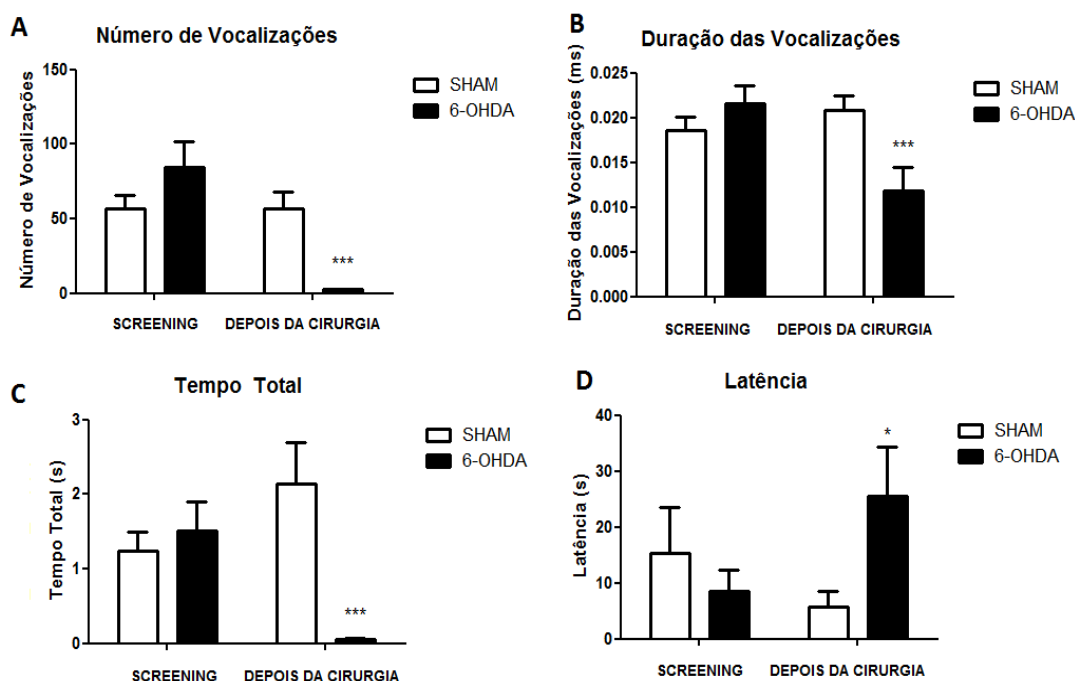


Figura 11: Efeito da lesão bilateral com 6-OHDA na substância negra pars compacta (SNpc) no teste de vocalização ultrassônica de 50kHz. Os grupos SHAM e 6-OHDA foram testados antes da cirurgia (screening) e depois da cirurgia. (A) Número de chamadas; (B) Duração das chamadas; (C) Tempo total de chamadas; (D) Latência. Os dados representam a média + EPM, SHAM - N=25, 6-OHDA N=24. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ em comparação com o grupo SHAM+veículo.

A figura 12 mostra os diferentes tipos de vocalização de 50 kHz (flat, trill, step). Ratos lesionados com 6-OHDA bilateralmente na SNpc, no screening, apresentaram o tipo predominante de vocalização flat (94%), seguido de trill (5%) e step (1%). Após a cirurgia, esses números foram semelhantes aos de flat (89%), trill (8%) e step (3%), lembrando que o número total de vocalizações foi extremamente baixo nesse momento.

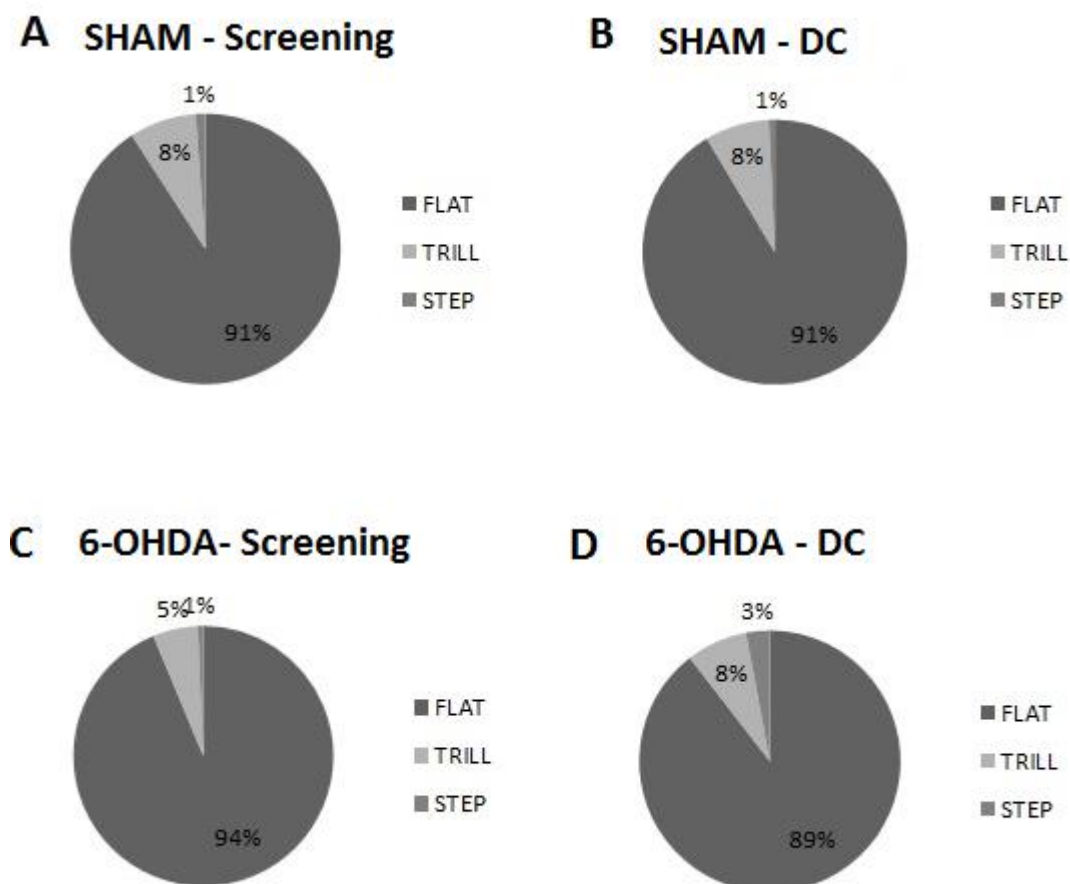


Figura 12: Efeito da lesão bilateral com 6-OHDA na substância negra *pars compacta* (SNpc) no teste de vocalização ultrassônica de 50kHz. Os ratos SHAM e 6-OHDA foram testados antes da cirurgia (screening) e depois a cirurgia (DC). Tipos de USVs: flat, trill e step. (A) SHAM screening: flat (91%), trill (8%), step (1%); (B) SHAM DC, flat (91%), trill (8%), step (1%); (C) 6-OHDA screening, flat (94%), trill (5%), step (1%); (D) 6-OHDA DC, flat (89%), trill (8%), step (3%).

Tentando reverter as mudanças no perfil de vocalização dos ratos do grupo 6-OHDA, foi realizado o tratamento com: veículo - uma vez por semana, cetamina: 5, 10 ou 15 mg/kg, uma vez por semana e imipramina 20mg/kg, diariamente, durante 4 semanas. Na figura 13, pode ser visto que a cetamina em todas as doses de tratamento não foi capaz de aumentar o número de vocalizações, quando comparados com os ratos 6-OHDA+ veículo ($p > 0,05$).

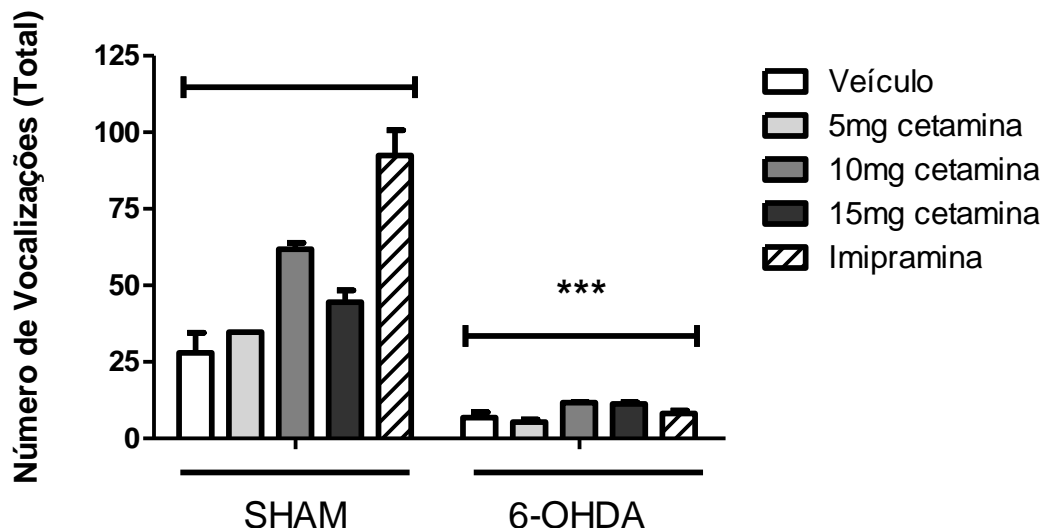


Figura 13: Efeito do tratamento farmacológico no Teste de Vocalização Ultrassônica de 50kHz de ratos lesados com 6-OHDA na substância negra *pars compacta* (SNpc). Os grupos SHAM e 6-OHDA foram tratados com cetamina (5, 10 ou 15 mg / kg, IP, uma vez por semana), imipramina (20 mg/kg, IP, diariamente) ou veículo (IP, uma vez por semana). Momento: 4 semanas após o início do tratamento. Todos os animais lesados com 6-OHDA apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo SHAM+ veículo, *** $p < 0.001$. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos 6-OHDA tratados, $p > 0,05$.

4.10 Teste de Catwalk para Avaliação da Marcha

Alguns parâmetros analisados apresentaram diferenças estatísticas (figura 14). Inicialmente, os animais foram submetidos ao Catwalk e seus dados foram comparados antes e depois a cirurgia. Os ratos 6-OHDA tiveram uma duração de corrida média significativamente superior aos ratos SHAM quando testados depois da cirurgia ($p < 0,001$) (figura 14A). Quando foi realizado o tratamento com cetamina nos grupos 6-OHDA, nas três doses administradas (5, 10 e 15 mg/kg), houve redução da duração da corrida dos animais, quando comparamos com o grupo 6-OHDA+veículo e 6-OHDA+imipramina (figura 14B).

Outro parâmetro afetado pela lesão com 6-OHDA foi a postura da pata, chamada Stand (tempo que uma pata permanece em contato com a plataforma) da pata RF (right front – direita frontal) ($p < 0,001$) quando

comparada aos animais SHAM (figura 14C). Depois do tratamento com os fármacos, não houve diferença estatística entre os grupos (figura 14D).

Os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

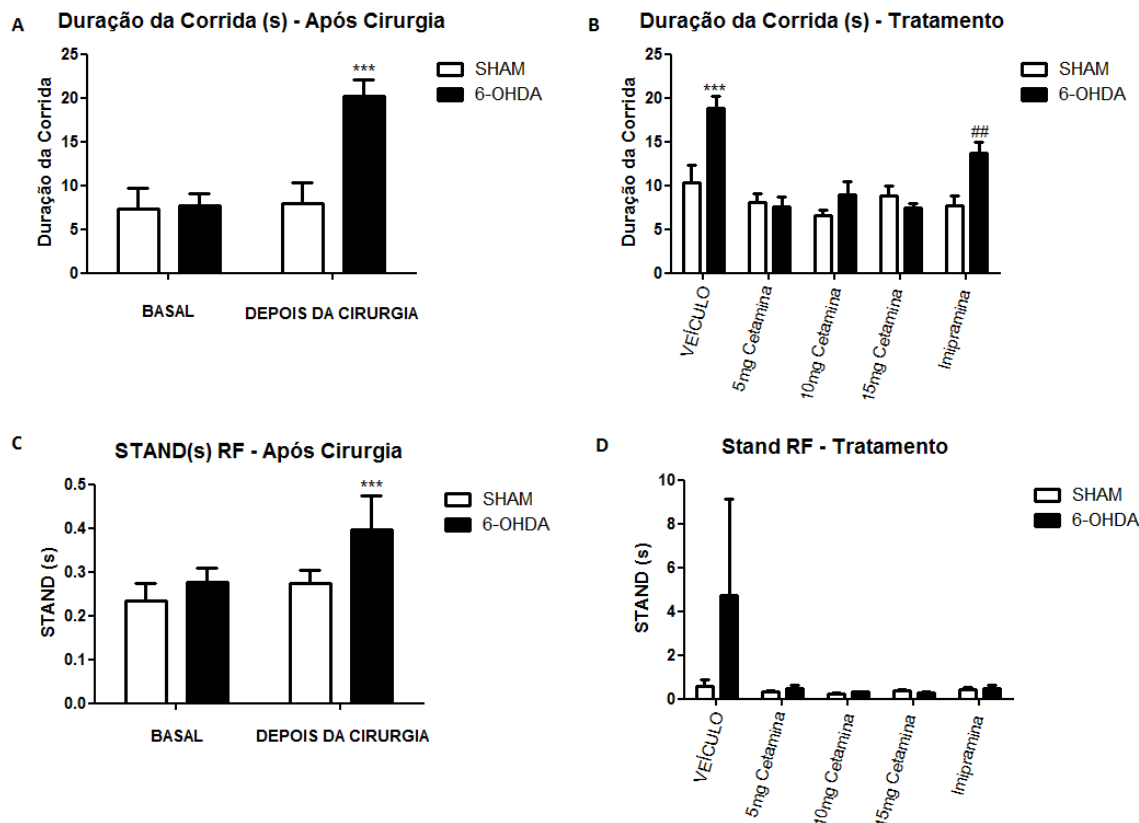


Figura 14: Efeito da lesão da substância negra *pars compacta* (SNpc) nos parâmetros de marcha analisados pelo CatWalk (A e B) e influência do tratamento farmacológico (C e D). (A) Duração da corrida; (B) Duração da corrida após o tratamento; (C) Stand RF (pata dianteira direita); (D) Stand RF após o tratamento. Os ratos SHAM (n=25) e 6-OHDA (n=24) foram testados antes da cirurgia (basal) e após a cirurgia. Tratamentos: cetamina (5, 10 ou 15 mg / kg, i.p., uma vez por semana), imipramina (20 mg / kg, i.p. diariamente) ou veículo (i.p., uma vez por semana); N = 4-6 / grupo. Os dados representam a média+EPM. (*) $0.05 < p < 0.06$ e *** $p \leq 0.001$ comparado com o grupo SHAM+grupo veículo; ### $p \leq 0.001$ com o grupo 6-OHDA+veículo; % $p < 0,05$ quando comparados com os grupos cetamina (5, 10 e 15).

4.11 Correlações entre preferência por sacarose, número de vocalizações e alterações motoras (teste Catwalk) em ratos com lesão bilateral de SNc

As correlações entre o teste de preferência de sacarose, os parâmetros de Catwalk (duração de corrida e Stand da RF) e USV de 50 kHz após a cirurgia foram calculadas usando o resultado do teste de preferência de sacarose da medida mais próxima ao registro USV ou à análise da marcha (14 e 7 dias após a cirurgia). Existe uma correlação positiva significativa entre a preferência de sacarose e a USV de 50 kHz ($r = + 42$, $p < 0,01$). Por outro lado, são observadas correlações negativas significativas entre: duração da corrida e preferência de sacarose ($r = - 80$; $p < 0,001$) e USV de 50 kHz ($r = - 51$; $p < 0,001$); (RF) e preferência de sacarose ($r = - 40$; $p < 0,01$) e 50 kHz USV ($r = - 29$; $p < 0,05$) (figura 15).

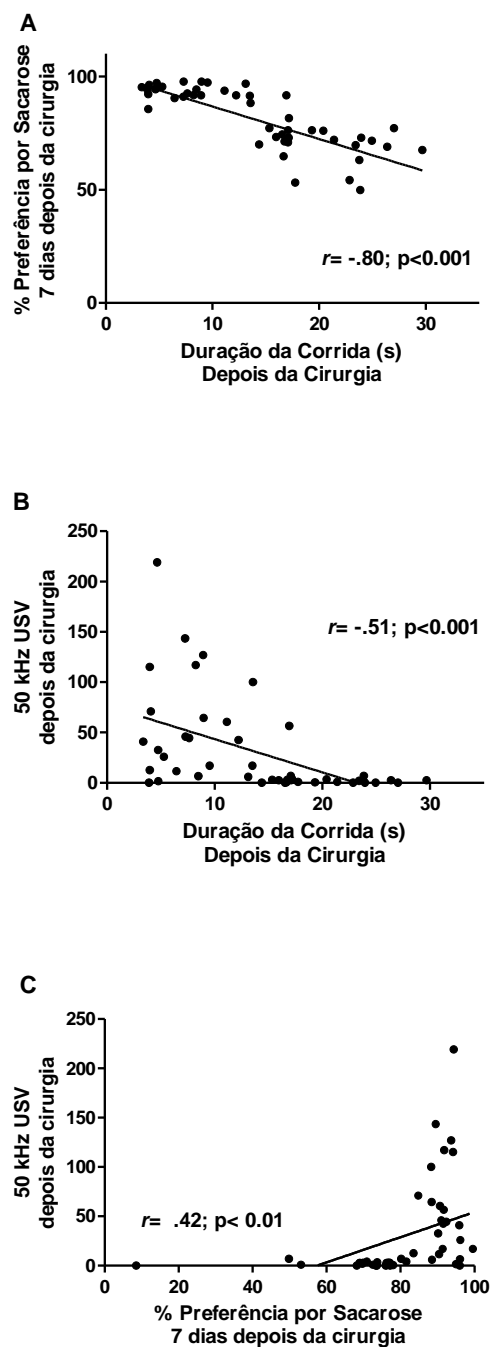


Figura 15: Correlações entre o parâmetro da marcha (duração da corrida), USV de 50 kHz e teste de preferência de sacarose em ratos com lesão bilateral da substância negra *pars compacta* (SNpc) (induzida por 6-OHDA). (A) % de preferência de sacarose e duração da corrida; (B) 50 kHz USV (número de chamadas totais) e duração da corrida; (C) 50 kHz USV (número de chamadas totais) e % de preferência de sacarose. R: coeficiente de correlação de Pearson; N = 48

5. DISCUSSÃO

5.1 1ª Coorte de Ratos (Experimento 1)

O presente estudo indicou que a cetamina reverteu o comportamento tipo depressivo e o comprometimento de memória de reconhecimento social induzidos por lesão bilateral de SNpc com 6-OHDA. Este modelo tem sido utilizado para reproduzir alterações cerebrais e características comportamentais semelhantes às encontradas em seres humanos (Schwartz e Huston, 1996; Bové e Perier, 2012; Schintu *et al.*, 2012). Nesta linha, vários estudos observaram um aumento nos comportamentos tipo depressivos e comprometimento da memória em ratos com lesões nigro-estriatais induzidas por 6-OHDA (Schintu *et al.*, 2012; Solari *et al.*, 2013). No presente estudo observou-se um aumento da imobilidade no TNFM e uma diminuição na preferência de sacarose no TPS, parâmetros que indicam comportamento tipo depressivo, corroborando estudos prévios. A anedonia (redução significativa na preferência de sacarose) foi observada em ratos com lesão de 6-OHDA a partir do 7º dia após a cirurgia e foi mantida até ao dia 42, o que está de acordo com os dados obtidos por Santiago *et al.* (2014). O padrão comportamental observado no teste de natação forçada mostrou um aumento na frequência de imobilidade e uma redução da frequência de natação, sugerindo que esse efeito está relacionado à neurotransmissão de 5-HT e da DA (Cryan *et al.*, 2005). Estas observações foram detectadas por Santiago *et al.* (2014), que também correlacionou esse comportamento tipo depressivo com o nível reduzido de 5-HT no hipocampo de ratos. Além disso, a imipramina, antidepressivo tricíclico, usada como controle positivo, também reverteu o comportamento tipo depressivo. Assim, esses resultados validam os procedimentos aqui empregados e reforçam a significância dos efeitos da cetamina.

A cetamina exerceu efeito antidepressivo em ratos com lesão da SNpc induzida por 6-OHDA. Esse efeito foi observado no teste de preferência por sacarose e no teste de natação forçada modificada em doses que não alteraram a atividade locomotora em ratos SHAM e 6-OHDA. Considerando

que este efeito antidepressivo foi observado após a primeira semana de tratamento (teste de preferência por sacarose) e é mantido até a terceira (teste de preferência de sacarose) e a quarta semana de tratamento (teste de natação forçada), sugerem uma atividade antidepressiva prolongada. No teste de natação forçada modificada, os ratos lesionados com 6-OHDA tratados com veículo aumentaram a frequência de imobilidade e o tratamento com cetamina (em todas as doses) reverteu este parâmetro, aumentando a frequência de natação (doses mais baixas) e de escalada (dose elevada). O aumento da frequência de natação pode estar associado a um efeito serotoninérgico (Detke *et al.*, 1995; Cryan *et al.*, 2005; Consoni *et al.*, 2006). O aumento da escalada com a dose mais alta de cetamina (15mg/kg) sugere um efeito noradrenérgico/dopaminérgico (Detke *et al.*, 1995; Consoni *et al.*, 2006). Nesta linha, a imipramina, um antidepressivo tricíclico que inibe a recaptação de serotonina e noradrenalina, aumentou os comportamentos de natação e de escalada. Esse fato está de acordo com o que foi proposto anteriormente, sugerindo que a 5-HT (Gigliucci *et al.*, 2013, Du Jardin *et al.*, 2016a, 2016b) e dopamina (Li *et al.*, 2015) têm um papel significativo no efeito do tipo antidepressivo da cetamina.

Conforme descrito na literatura, a cetamina tem um início de ação antidepressiva rápida (poucos dias), diferindo dos antidepressivos monoaminérgicos convencionais que levam em torno de 3 semanas para iniciar o efeito antidepressivo (Duman, 2012; Naughton *et al.*, 2014; Brahman *et al.*, 2016). Além disso, dados pré-clínicos e clínicos sugerem que a cetamina pode ter interessante eficácia na discinesia induzida por L-DOPA (Bartlett *et al.*, 2016, Sherman *et al.*, 2016). Tomados em conjunto, esses aspectos tornam a cetamina uma droga interessante, principalmente para pacientes que necessitam de um efeito antidepressivo rápido e também para aqueles que são refratários à terapia convencional ou estão tomando L-DOPA. A administração uma única vez por semana seria outro benefício da droga, uma vez que iria melhorar a adesão do paciente ao tratamento. A desvantagem seria a necessidade de internamento hospitalar para monitorar os sinais vitais do paciente durante a infusão intravenosa, seu potencial como droga de abuso e efeitos colaterais psicóticos (Naughton *et al.*, 2014).

A cetamina também reverteu o prejuízo de memória social apresentado pelos ratos com lesão nigral de 6-OHDA. Sabe-se que os pacientes com DP também sofrem perda de memória, principalmente a chamada memória procedural, que é dependente do estriado e isso dificulta o desempenho de certas atividades. Estes prejuízos de memória foram identificados em modelos animais de DP. Por exemplo, em ratos com lesão do sistema nigrostriatal observou-se deficiências na tarefa de labirinto aquático de Morris (Myioishi *et al.*, 2002; Tadaiesky *et al.*, 2008; Prediger *et al.*, 2010), no teste de esquiva ativa bidirecional (Daun *et al.*, 2001), no teste de reconhecimento social (Tadaiesky *et al.*, 2008; Prediger *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012) e esquiva inibitória gradual (Prediger *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012). O teste de reconhecimento social foi escolhido, pois é útil para evidenciar possíveis danos na memória social de curto prazo.

No presente estudo, utilizou-se o RID, que avalia a relação entre a segunda e a primeira exposição e observou-se que os animais tratados com 6-OHDA e tratados com veículo apresentaram maior RID que o grupo SHAM tratado com veículo. Este fato sugere que os animais com lesões em neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal demonstraram um prejuízo da memória de curto prazo. Portanto, o presente estudo está de acordo com dados anteriores (Tadayeski *et al.*, 2008; Prediger *et al.*, 2010). A cetamina (em todas as doses), assim como a imipramina, foram capazes de reverter esse comprometimento na memória social. Considerando que a dose anestésica de cetamina está associada ao comprometimento da memória, é interessante salientar que as baixas doses utilizadas no presente estudo, induziram o efeito oposto (melhora do prejuízo de memória induzido por 6-OHDA). Este efeito da cetamina corrobora o que tinha sido observado com outros antagonistas de NMDA. Por exemplo, o MK-801, um antagonista de NMDA, impediu o comprometimento da memória de trabalho no labirinto em T, induzido pela administração intranigral de MPTP (Hsieh *et al.*, 2012). A d-cicloserina, um agonista parcial do receptor NMDA, que atua como um antagonista quando há hiperatividade do sistema glutamatérgico atenuou o déficit de memória em ratos com lesão nigral (Ho *et al.*, 2011).

Uma importante variável de confusão na avaliação do comportamento tipo depressivo e no desempenho em tarefas que exigem memória em modelos de DP, é a atividade locomotora (Schintu *et al.*, 2012). Os resultados obtidos com o teste em campo aberto indicaram que qualquer lesão (infusão de 6-OHDA ou administração de fármaco sistêmico) tem capacidade de induzir comprometimento locomotor, o que está de acordo com outros estudos (Ariza *et al.*, 2010; Santiago *et al.*, 2015). Além disso, os dados presentes demonstraram que o tratamento repetido com cetamina ou imipramina não alterou a atividade locomotora. Isso nos indica que a atividade motora não teve influência nos testes comportamentais. Dessa forma, esses resultados reforçam a proposta de modelagem da sintomatologia pré-motora ou

da DP (Da Cunha *et al.*, 2001; Tadaiesky *et al.*, 2008). De acordo com os dados observados, a dose relativamente baixa de 6-OHDA (6µg/mg) utilizada no presente estudo causou uma lesão na SNpc menos intensa do que doses mais elevadas (por exemplo 8 µg/µl, Vecchia *et al.*, 2015), mimetizando uma fase intermediária da DP. Essa concentração já foi anteriormente utilizada para estudar o prejuízo da memória e/ou comportamento tipo depressivo (Schwartz e Huston, 1996; Fukuzaki *et al.*, 2000; Bove *et al.*, 2005; Blandini *et al.*, 2007).

Com relação à imuno-histoquímica de tirosina hidroxilase, houve uma redução significativa na intensidade de coloração de TH na SNpc do grupo 6-OHDA+veículo em comparação com ratos SHAM+ veículo. Novamente, esses resultados estão de acordo com dados anteriores de Santiago *et al.* (2015), ressaltando a reprodutibilidade do modelo. A cetamina (em todas as doses) e os grupos tratados com imipramina não atenuaram a diminuição da população de neurônios TH-ir na SNpc, induzida por 6-OHDA. Isso sugere que a reversão do comportamento tipo depressivo e do prejuízo de memória provavelmente não foi relacionado à neuroproteção de neurônios dopaminérgicos. Contudo, é importante considerar que a cetamina exerceu um efeito neuroprotetor quando administrado antes da 6-OHDA ou MPTP (Ferro *et al.*, 2007), o que sugere que poderia reduzir a progressão da neurodegeneração. Assim, a administração precoce de cetamina poderia ter impacto na progressão da doença, uma hipótese que necessita de estudos adicionais.

Conforme mencionado anteriormente, a cetamina não apenas bloqueia os receptores NMDA de glutamato, mas, também pode modular outras funções importantes neuronais, tais como o aumento de BDNF e de sinaptogênese (Garcia *et al.*, 2008; Jet *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016). O BDNF é um regulador chave da proteína alvo na sinalização da rapamicina mamária (mTOR) e da plasticidade sináptica, estimulando a maturação das espinhas dendríticas, síntese proteica e transmissão sináptica. A ativação de receptores de AMPA por aumento da liberação de glutamato (secundária ao bloqueio dos receptores NMDA por cetamina) leva à libertação de BDNF no córtex pré-frontal, que por sua vez estimula mTOR e também a formação de espinhas dendríticas (Duman *et al.*, 2012; Naughton *et al.* 2014). Os antidepressivos monoaminérgicos usados na clínica, através da modulação de NA e/ou 5-HT, também aumentam os níveis de BDNF em algumas regiões do sistema límbico, mas para tal, levam um tempo mais longo (Duman e Monteggia, 2006).

Estudos recentes sugerem que a cetamina é capaz de reverter a discinesia tardia induzida pela L-DOPA, principal fármaco utilizado para tratar os sintomas motores da DP. Tanto em seres humanos (Sherman *et al.*, 2016) quanto em modelo animal unilateral de 6-OHDA (Bartlett *et al.*, 2016), infusões contínuas de cetamina em baixas doses melhoram a discinesia. O mesmo não ocorre quando se administram doses isoladas de cetamina. Nestes casos, a quantidade de dopamina estriatal não foi aumentada quando medida por dosagem eletroquímica. Estes dados são semelhantes aos que encontramos, ressaltando a hipótese de que a cetamina age através de outros mecanismos, capazes de melhorar a discinesia e a depressão, portanto, representa uma alternativa interessante para o tratamento clínico tanto da DP quando da depressão associada (Bartlett *et al.*, 2016).

5.2. 2ª Coorte de Ratos (Experimento 2)

O presente estudo mostra que a lesão bilateral na SNpc com 6-OHDA alterou o perfil de vocalização ultrassônica de 50 kHz ao mesmo tempo que induziu anedonia (reproduzindo o experimento 1), mas induz poucos comprometimentos da marcha. Dessa forma, esses resultados estão de acordo com a proposta de que este modelo animal reproduz um estágio

intermediário da DP (Cunha *et al.*, 2002; Ferro *et al.*, 2005; Branchi *et al.*, 2008; Simola *et al.*, 2007; Tadaiesky *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2010, 2014). Além disso, observou-se que a cetamina e a imipramina foram capazes de reverter o comportamento tipo depressivo e alguns parâmetros da marcha, mas não afetaram as alterações de USV induzidas pela lesão. Isto sugere que embora estas alterações induzidas pela lesão nigral compartilhem aspectos comuns (por exemplo, início de perda de neurónios dopaminérgicos na SNpc), elas também têm importantes diferenças neurobiológicas que resultam em resposta farmacológica diferente.

Com relação as USVs de 50 kHz, estas parecem ser susceptíveis à degeneração da via nigroestriatal em modelos animais de DP, como demonstrado anteriormente (Ciucci *et al.*, 2007, 2009; Kelm-Nelson *et al.*, 2016). Além disso, as vocalizações ultrassônicas produzidas por roedores são análogas à fala humana de muitas maneiras (Ciucci *et al.*, 2009). Ciucci *et al.* (2007) utilizou infusão de 6-OHDA unilateralmente no feixe prosencefálico medial e observou nos subtipos “trill” de USV de 50 kHz uma redução na largura de banda, semelhante à demonstrada pela administração sistêmica de haloperidol. Em um estudo semelhante, utilizando também a 6-OHDA unilateral, observou-se uma redução na emissão de USVs de 50 kHz, tipo frequência modulada (trill e step). Além disso, enquanto as USVs de FM foram mais frequentemente observadas no grupo controle, as chamadas simples (flat) foram o subtipo predominante no grupo lesionado com 6-OHDA (Ciucci *et al.*, 2009).

Este efeito da lesão no feixe prosencefálico medial está associado à redução da neurotransmissão dopaminérgica. Ratos com lesão unilateral induzida por 6-OHDA no feixe prosencefálico medial exibem correlações significativas entre os parâmetros de USVs de 50 kHz (intensidade de chamadas simples, duração e largura de banda das USVs de FM) e perda de tirosina hidroxilase no estriado, 4 semanas após a lesão. Nestes estudos de lesão no feixe prosencefálico medial, as USVs de 50 kHz foram induzidas pela exposição do macho à uma fêmea na fase fértil do ciclo estral. Entretanto, os pacientes com DP e os roedores com lesões nigroestriais (modelos animais de DP) podem apresentar algum grau de hiposmia (perda de olfato parcial)

(Prediger *et al.*, 2006), que podem influenciar a percepção de odores femininos. Por outro lado, foi citado (dados não mostrados pelos autores) que a lesão unilateral no feixe prosencefálico medial não alterou a discriminação de odor (Kelm-Nelson *et al.*, 2016). Também é importante ressaltar que a USV é uma importante forma de comunicação (Brudzynski, 2015; Rippberger *et al.*, 2015) e as mudanças observadas nos modelos de DP podem ter um impacto negativo significativo na qualidade de vida. Por exemplo, ratos normais respondem menos a USV do que ratos knockout para o gene PINK1, um modelo genético de PD (Kelm-Nelson *et al.*, 2015). Nesta linha, o presente trabalho é o primeiro que avaliou USV de 50 kHz em ratos com lesão bilateral da SNpc. Em concordância com estudos de lesões unilaterais, observou-se que ratos com lesões bilaterais de SNpc apresentaram redução no número total de USV de 50 kHz, redução da duração de cada vocalização, redução do tempo total de vocalização e aumento da latência para iniciar a vocalizar.

Na DP, quando há uma redução de dopamina no sistema nigroestriatal, a musculatura da laringe também parece ser afetada. Os pacientes com DP mostram frequentemente alterações de voz e de deglutição, que podem aparecer antes dos sintomas motores clássicos e podem afetar negativamente a qualidade de vida e a comunicação desses indivíduos (Ploughman-Prine *et al.*, 2009; Ciucci *et al.*, 2013). Essas alterações geralmente precedem os sinais motores clássicos e foram consideradas biomarcadores para o diagnóstico precoce da DP (Sung *et al.*, 2010; Postuma *et al.*, 2012).

Por outro lado, considerando que a vocalização está associada ao estado afetivo (Burgdorf *et al.*, 2007; Wöhr e Schwarting, 2013; Brudzynski, 2015) e que a depressão também pode preceder a deficiência motora na DP, a redução de USV de 50 kHz poderia estar relacionada à motivação reduzida ou ao estado depressivo e não associada a alteração muscular da laringe (Kelm-Nelson *et al.*, 2016).

No presente estudo, o número total de USV de 50 kHz mostrou uma baixa correlação com a duração da corrida e com a preferência por sacarose, o indicador de comportamento de tipo depressivo. Além disso, a imipramina reverteu a anedonia induzida pela lesão, não afetou a redução das USVs de 50

kHz nestes ratos. Na mesma linha, a cetamina que melhorou tanto o comprometimento da marcha quanto a anedonia nesses ratos, não teve efeito sobre as alterações nas USVs de 50 kHz. Kelm-Nelson *et al.* (2016) também cita que ratos com lesão no feixe prosencefálico medial unilateral induzida por 6-OHDA não aumentaram a latência para acasalamento (dados não mostrados), indicando que não há redução da motivação desses animais, que também apresentam mudança nas USVs de 50 kHz. Assim, em modelos de DP, as USVs de 50 kHz parecem ser independentes do comportamento tipo depressivo. É interessante ressaltar que as alterações vocais em pacientes com DP e em modelos animais têm sido consideradas insensíveis ao tratamento farmacológico atual da DP (Ciucci *et al.*, 2013, Johnson *et al.*, 2015), o que corrobora os resultados desse trabalho.

Para analisar a marcha e deficiências motores sutis de ratos com lesão nigral bilateral, utilizou-se o sistema Catwalk. Alguns estudos prévios não observaram alterações motoras em ratos lesionados, testados no campo aberto ou no rotarod (Tadaiesky *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2011; Schintu *et al.* 2012; Santiago *et al.*, 2010, 2015) Entretanto, esses testes motores convencionais podem não ser sensíveis a mudanças motoras sutis ou relacionadas à marcha do animal (Schintu *et al.*, 2012). O sistema Catwalk é capaz de avaliar simultaneamente muitos parâmetros estáticos e dinâmicos relacionados à marcha, que têm sido relacionados aos sintomas motores da DP. Observa-se que a lesão unilateral do feixe prosencefálico medial ou do estriado causa alterações significativas em alguns parâmetros de marcha, como, por exemplo: a intensidade de pressão da pata, a área máxima de contato da pata, a velocidade de oscilação, a postura, alternância dos passos, a impressão terminal das patas e a postura terminal (Chuang *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2015). O stand em segundos, que se refere à duração do contato da pata com a passarela quando aumentado, pode ser comparado a bradicinesia humana (lentidão para iniciar movimentos) (Chuang *et al.*, 2010). Além disso, estas alterações da marcha foram significativamente correlacionadas com a redução da expressão de TH no núcleo caudado e putâmem e na SNpc. Assim como nos estudos prévios com USV, todos esses estudos usando Catwalk também utilizaram lesão unilateral no sistema nigroestriatal, principalmente, apresentando algumas das limitações descritas anteriormente. Nesta linha,

Vlamings *et al.* (2007), também usando o sistema Catwalk, observaram que ratos com lesões bilaterais do estriado induzidas por 6-OHDA levaram mais tempo para atravessar a passarela e tiveram a duração e a velocidade de oscilação dos membros traseiros prejudicadas. Na mesma linha, Westin *et al.* (2012) observaram que a lesão bilateral de 6-OHDA no feixe preosencefálico medial, causando 70% de perda de DA no estriado, induziu comprometimento da marcha que afeta o comprimento da passada, a velocidade de oscilação, a duração da postura e a duração das passadas. Além disso, ratos lesionados demoraram mais para percorrer a passarela em todas as corridas realizadas. É interessante que os camundongos tratados sistemicamente com MPTP (afetando a via nigroestriatal bilateralmente) apresentaram mudanças na marcha observadas no Catwalk, incluindo o aumento da duração da corrida e menos atividade locomotora no campo aberto. Contudo, apenas as alterações da marcha foram significativamente correlacionadas com a expressão de TH na SNpc (Wang *et al.*, 2012). Do mesmo modo, no presente estudo, os ratos com lesão bilateral da SNpc demoraram mais tempo para atravessar a plataforma (duração da corrida) e alteraram o Stand da pata dianteira direita, destacando possíveis dificuldades para iniciar movimentos ou deficiências locomotoras menores. No entanto, contrariamente a estes resultados, Jansen *et al.* (2012) não observaram nenhuma alteração na análise de CatWalk de ratos com lesão estriatal leve (20-40% de perda de DA na SNpc) induzida por 6-OHDA, sugerindo que esses prejuízos podem ser dependentes da extensão da lesão na SNpc, o que pode ser útil para avaliar outros estágios de desenvolvimento da DP. Estudos prévios utilizando o mesmo procedimento para induzir lesão bilateral na SNpc conduziram a perda neuronal de 65-90%, evidenciando um quadro mais avançado da degeneração (Ferro *et al.* 2007, Santiago *et al.*, 2010; Vecchia *et al.*, Dados não publicados).

Em relação ao tratamento com fármacos, a cetamina, um antagonista de NMDA e imipramina, que inibe a recaptação de NA e 5-HT e bloqueia os receptores muscarínicos de acetilcolina, reduziram o tempo de duração da corrida. No entanto, o Stand pata dianteira direita não foi melhorado por qualquer tratamento com drogas. Embora o pré-tratamento com cetamina possa proteger a SNpc da neurotoxicidade de 6-OHDA (Ferro *et al.*, 2007) a cetamina não reverteu a perda de neurônios na SNpc quando administrada

durante 4 semanas após a cirurgia, como pode ser observado na expressão da TH no experimento 1. Estudos prévios com cetamina em modelos animais de DP apresentaram resultados mistos quando administrados isoladamente, mas podem aumentar o efeito da L-DOPA em deficiências motoras (Starr *et al.*, 1997). Outros antagonistas de NMDA também mostraram efeitos positivos em deficiências motoras em modelos DP. Kelsey *et al.* (2004) observaram que a dizolcipina (MK-801) e o CPP (ácido 3- (2-carboxipiperazin-4-il) propil-1-fosfônico) melhoraram os déficits progressivos induzidos pela lesão no feixe prosencefálico medial unilateral. Nesta linha, a dizolcipina reverteu a catalepsia induzida pelo haloperidol e a hipomotilidade induzida pela depleção monoaminérgica, acarretando no aumento da rotação ipsilateral em ratos com lesão unilateral da SNpc (Klockgether e Turski, 1990; Danysz *et al.*, 1994). A D-cicloserina, um agonista parcial que age no local de ligação da glicina do receptor NMDA, acelerou a recuperação do desempenho do rotarod em ratos com lesão bilateral da SNpc (Ho *et al.*, 2011). Como citado anteriormente, a cetamina reduziu a discinesia induzida por L-DOPA em ratos com lesão unilateral do feixe prosencefálico medial (Bartlett *et al.*, 2016). Assim, estes resultados podem sugerir uma eficácia limitada da cetamina nas alterações da marcha da DP. É interessante que a imipramina também tenha efeito positivo na duração da corrida, sugerindo alguma eficácia no comprometimento da marcha.

Por outro lado, os sintomas não-motores da DP, que atingem a maioria dos pacientes e geralmente aparecem antes dos sintomas motores, têm seus mecanismos fisiopatológicos ainda não completamente compreendidos (Sharma *et al.*, 2013, Antonelli e Strafella, 2014). Conforme mencionado anteriormente, o modelo 6-OHDA demonstrou ser útil para o estudo do comportamento depressivo de ratos, de forma semelhante à depressão encontrada em humanos (Santiago *et al.*, 2010, 2015, Schintu *et al.*, 2012, Solari *et al.*, 2013). Da mesma forma observada no experimento 1, o comportamento de tipo depressivo de ratos no experimento 2 foi medido pelo teste de preferência de sacarose (Martynhak *et al.*, 2011), considerado um bom marcador para o comportamento depressivo em modelos PD (Schintu *et al.*, 2012). Teoricamente, a deficiência motora pode influenciar a ingestão de água e sacarose igualmente, não alterando a preferência de sacarose. No entanto,

existe uma forte correlação negativa entre a preferência pela sacarose e a duração da corrida, o que sugere uma relação entre eles. Esta associação pode estar relacionada a um mesmo mecanismo fisiopatológico inicial (depleção de dopamina na SNpc) e pode não indicar relação da preferência pela sacarose em relação ao comprometimento da marcha. Por outro lado, é interessante notar que tanto a cetamina como a imipramina reverteram a anedonia e a duração da execução.

Da mesma forma relatada no experimento 1, observou-se que todas as doses de cetamina reverteram o comportamento depressivo dos grupos lesados 6-OHDA, logo após a sua primeira administração. Contudo, tanto a cetamina como a imipramina foram incapazes de reverter a alteração vocal do rato. O efeito antidepressivo da imipramina tem sido relacionado aos seus efeitos monoaminérgicos que podem levar ao aumento do BDNF e à neurogênese. A ação antidepressiva da cetamina tem sido associada ao alvo mamífero da estimulação da rapamicina (mTOR) e ao aumento rápido dos níveis de BDNF e da neurogênese.

Reforçando o interesse pelo potencial efeito antidepressivo da cetamina em pacientes com DP, estudos sugeriram que a cetamina também pode ser útil no tratamento da discinesia induzida pela L-DOPA, principal droga usada para tratar os sintomas motores da DP. Ambos os relatos de casos clínicos (Sherman *et al.*, 2016) e estudo pré-clínico usando o modelo animal unilateral de 6-OHDA (Bartlett *et al.*, 2016) observaram que baixas doses de cetamina melhoram os sinais de discinesia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo demonstram que o modelo animal de DP induzido pela injeção de 6-OHDA bilateral na SNpc induziu comportamento tipo depressivo nos ratos, o qual foi observado até o 56º dia depois da cirurgia. A cetamina foi administrada uma vez por semana, durante 4 semanas e reverteu o comportamento logo após a primeira administração, mantendo seu efeito até o final do experimento.

Da mesma forma, no teste de natação forçada modificada, a cetamina foi capaz de reduzir a imobilidade dos animais tratados, nas três doses. Também aumentou a natação (todas as doses) e a escalada (15 mg/kg) o que sugere envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico, respectivamente.

A 6-OHDA também foi capaz de desenvolver prejuízos de memória de curto prazo nos ratos, como foi observado no grupo 6-OHDA+veículo pelo teste de reconhecimento social. A cetamina reverteu esse prejuízo, de modo que o RID (razão entre a segunda e a primeira exposição do rato jovem ao rato adulto) foi menor para os grupos tratados com as 3 doses de cetamina.

Com relação à vocalização ultrassônica, podemos destacar a redução significativa no número de vocalizações de 50 kHz dos animais lesionados com 6-OHDA. Além disso, houve alteração nos parâmetros não acústicos (duração de cada USV, tempo total de emissão de USVs e na latência para início da vocalização). Todos os tipos de vocalização de 50 kHz foram reduzidos: flat, trill e step. Isso se deve, provavelmente, à redução expressiva da dopamina estriatal dos animais, que culmina em alterações motoras, entre elas, a alteração vocal.

A cetamina não foi capaz de reverter a redução no número de vocalizações nem os demais parâmetros não acústicos, o que, provavelmente, não aumentou a quantidade de dopamina estriatal. Isso sugere que a mesma atua em outra via, pois foi capaz de reverter o comportamento tipo depressivo dos mesmos animais.

Para evidenciar alterações motoras mais finas, que são dificilmente observadas em outros testes que avaliam atividade motora, os ratos foram submetidos ao teste de Catwalk. Foram observadas algumas alterações

motoras (stand RF, duração da corrida) nos animais 6-OHDA após a cirurgia e quando tratados com cetamina. Por outro lado, o número amostral de cada grupo foi pequeno e a dose de 6-OHDA utilizada pode ter sido pequena para desenvolver alterações motoras mais evidentes. Porém, pode-se sugerir que se trata de um modelo de DP intermediário, onde os sintomas motores clássicos não estão completamente estabelecidos, mas as alterações vocais já são perceptíveis, assim como ocorre em humanos.

A imunohistoquímica para neurônios TH imunorreativos demonstrou morte neuronal significativa no grupo 6-OHDA tratado com veículo, que não foi revertida com cetamina nas três doses administradas. Isso indica que não houve neuroproteção e que a dopamina continuou reduzida na SNpc desses animais.

Portanto, sugerimos que o mecanismo de ação da cetamina não se dá pela modulação do sistema dopaminérgico, mas, por modulação do glutamato através de seu antagonismo de receptores NMDA, bem como, pode atuar em outras moléculas, como no aumento dos níveis de BDNF ou na mTOR.

7. CONCLUSÃO

Os resultados reforçam a hipótese de que a lesão bilateral da SNpc seria um modelo de fase intermediária da DP, induzindo alterações motoras e não motoras (depressão e prejuízos de memória).

A alteração no perfil de vocalização nos animais lesados com 6-OHDA foi provavelmente decorrente da redução dos níveis de dopamina na via nigroestriatal. Esse sintoma motor não foi alterado pelo tratamento farmacológico, da mesma maneira observada na clínica.

Finalmente, o presente estudo mostrou que a cetamina possui atividade antidepressiva em comportamentos tipo depressivo e reverte a perda de memória social em modelo animal de 6-OHDA da Doença de Parkinson, sem piorar o desempenho motor. Estes resultados reforçam a hipótese de que o sistema glutamatérgico seria um alvo relevante para o tratamento da depressão e do comprometimento da memória associado à DP. Reforçam também a hipótese de que a cetamina, um medicamento já em uso clínico, pode ser um tratamento útil para DP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAN HET ROT, M., ZARATE, C. A. JR., CHARNEY, D. S., MATHEW, S. J., 2012. Ketamine for depression: where do we go from here? **Biol. Psychiatry**. v. 72, p. 537-547.

AARSLAND, D., PAHLHAGEN, S., BALLARD, C.G., EHRT, U., SVENNINGSSON, P., 2012. Depression in Parkinson disease-epidemiology, mechanisms and management. **Nat. Rev. Neurol.** v. 8, p. 35-47.

ABELIOVICH, A., GITLER, A. D., 2016. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. **Nature**. v. 5397, n. 7628, p. 207-216.

ABID SHEIKH, M., SAEED MALIK, Y., XING, Z., GUO, Z., TIAN, H., ZHU, X., CHEN, X., 2016. Polylysine-modified polyethylenimine (PEI-PLL) mediated VEGF gene delivery protects dopaminergic neurons in cell culture and in rat models of Parkinson's Disease (PD). **Acta Biomater.** v. S1742-7061, n. 16, p. 30717-6.

ALONSO RECIO, L., MARTÍN, P., CARVAJAL, F., RUIZ, M., SERRANO, J. M., 2013. A holistic analysis of relationships between executive function and memory in Parkinson's disease. **J Clin Exp Neuropsychol.** v. 35, n. 2, p.147-59.

ALTHAUS, A., BECKER, O.A., SPOTTKE, A., DENGLER, R., SCHNEIDER, F., KLOSS, M., EGGERT, K., OERTEL, W.H., DILLMANN, U., HERTING, B., CLASSEN, J., DODEL, R., 2015. Frequency and treatment of depressive symptoms in a Parkinson's disease registry. **Parkinsonism Relat Disord.** v. 14, n. 8, p. 626-32.

ANTONELLI, F., AND STRAFELLA A. P., 2014. Behavioral disorders in Parkinson's disease: The role of dopamine. **Parkinsonism Relat Disord.** v. 20, p. S10- S12.

APOSTOLOVA, L., ALVES, G., HWANG, K. S., BABAKCHANIAN, S., BRONNICK, K. S., LARSEN, J. P., THOMPSON, P. M., CHOU, Y. Y., TYSNES, O. B., VEFRING, H. K., BEYER, M. K., 2012. Hippocampal and ventricular changes in Parkinson's disease mild cognitive impairment. **Neurobiol Aging.** v. 33, n. 9, p. 2113-24.

ARIZA, D., LIMA, M. M. S., MOREIRA, C. M., DOMBROWSKI, P. A., AVILA T.V., ALLEMAND, A., MENDES, D. A. G. B., DA CUNHA, C., VITAL, M. A. B. F., 2010. Intranigral LPS Administration Produces Dopamine, Glutathione but not Behavioral Impairment in Comparison to MPTP and 6-OHDA Neurotoxin Models of Parkinson's Disease. **Neurochem Res.** v. 35, p. 1620-1627.

BARKER, D. J., SIMMONS, S. J., WEST, M. O., 2015. Ultrasonic vocalizations as a measure of affect in pre clinical models of drug abuse: a review of current findings. **Curr. Neuropharmacol.** v. 13, n. 2, p.193–210.

BARTLETT, M. J., JOSEPH, R. M., LEPOIDEVIN, L. M., PARENT, K. L., LAUDE, N. D., LAZARUS, L. B., HEIEN, M. L., ESTEVEZ, M., SHERMAN, S. J., FALK, T., 2016. Long term effect of sub-anesthetic ketamine in reducing L-DOPA-induced dyskinesias in a preclinical model. **Neurosci Lett**, v. 612, p. 121-5.

BARTELS, A. L., LEENDERS, K. L., 2009. Parkinson's disease: The syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. **Cortex**, v. 45, n. 8, p. 915–921.

BEAR, M. F., CONNORS, B. W., PARADISO, M. A., 2002. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2ed. Artmed, Porto Alegre.

BELLISSIMO, M.I., KOUZMINE I., FERRO M.M., OLIVEIRA B.H., CANTERAS N.S., 2004. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? **Neurobiol Learn Mem**, v. 82, n. 2, p. 150-8.

BELVISI, D., CONTE, A., BOLOGNA, M., BLOISE, M. C., SUPPA, A., FORMICA A., COSTANZO, M., CARDONE, P., FABBRINI, G., BERARDELLI., 2016. A Re-emergent tremor in Parkinson's disease. Parkinsonism. **Relat Disord**, in press.

BLANDINI, F., NAPPI, G., TASSORELLI, C., MARTIGNONI, E., 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol**, v. 62, p. 63-88.

BOVÉ, J., PERIER, C., 2012. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76.

BOVE, J., SERRATS, J., MENGOD, G., CORTÉS, R., TOLOSA, E., MARIN, C., 2005. Neuroprotection induced by the adenosine A2A antagonist CSC in the 6-OHDA rat model of parkinsonism: effect on the activity of striatal output pathways. **Exp. Brain Res**, v. 165, p. 362-74.

BRACHMAN, R. A., MCGOWAN, J. C., PERUSINI, J. N., LIM, S. C., PHAM, T. H., FAYE, C., GARDIER, A. M., MENDEZ-DAVID, I., DAVID, D. J., HEN, R., DENNY, C. A., 2016. Ketamine as a Prophylactic Against Stress-Induced Depressive-like Behavior. **Biol Psychiatry**, v. 79, n. 9, p. 776-86.

BROWN, R.G., MACCARTHY, B., 1990. Psychiatric morbidity in patients with Parkinson's disease. **Psychol Med**, v. 20, n. 1, p. 77-87.

BRUDZYNSKI, S., 2005. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. **Behav Genet**, v.35, n. 1, p. 85–92.

BURGDORF, J., PANKSEPP, J., 2006. The neurobiology of positive emotions. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 30, n. 2, p. 173–187.

CAROD-ARTAL, F.J., ZIOMKOWSKI, S., MOURÃO, M. H., MARTÍNEZ-MARTIN P., 2008. Anxiety and depression: main determinants of health-related quality of life in Brazilian patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14, n. 2, p.102-8.

CARLSSON, M., CARLSSON, A., 1989. The NMDA antagonist MK-801 causes marked locomotor stimulation in monoamine-depleted mice. **J Neural Transm**, v. 75, n. 3, p. 221-226.

CARR, D. B., GOUDAS, L. C., DENMAN, W. T., BROOKOFF, D., STAATS, P. S., BRENNEN, L., 2004. Safety and efficacy of intranasal ketamine for the treatment of breakthrough pain in patients with chronic pain: a randomized, doubleblind, placebo-controlled, crossover study. **Pain**, v. 108, p.17–27.

CASTRO, A.A., GHISONI, K., LATINI, A., QUEVEDO, J., TASCA, C.I., PREDIGER, R.D., 2012. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, v. 229, n. 1, p. 208-215.

CHAUDHURI, K. R., SCHAPIRA, A. H., 2009. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 5, p. 464-74.

CHAUDHURI, K. R., HEALY, D. G., SCHAPIRA, A. H., 2006. National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p. 235-45.

CHUANG, C. S. SU, H. S., CHENG, F. C., HSU, S. H., CHUANG, C. F., LIU, C. S., 2010. Quantitative evaluation of motor function before and after engraftment of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease, **J. Biomed. Sci**, v. 17, p. 9-14.

CIUCCI, M. R., MA, S. T., FOX, C., KANE, J. R., RAMIG, L. O., SCHALLERT, R., 2007. Qualitative changes in ultrasonic vocalization in rats after unilateral dopamine depletion or haloperidol: a preliminary study. **Behav Brain Res**, v. 182, n. 2, p. 284-9.

CIUCCI, M. R., CONNOR, N. P., 2009. Dopaminergic influence on rat tongue function and limb movement initiation. **Exp Brain Res**, v. 94, n. 4, p. 587–96.

CIUCCI, M. R., MA, S. T., KANE, J. R., AHRENS, A. M., SCHALLERT, T., 2008. Limb use and complex ultrasonic vocalization in a rat model of Parkinson's disease: deficit-targeted training. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14, n. 2, p. S172–5.

CIUCCI, M. R., RUSSELL, J. A., SCHASER, A. J., DOLL, E. J., VINNEY, L. M., CONNOR, N. P., 2011. Tongue force and timing deficits in a rat model of Parkinson disease. **Behav Brain Res**, v. 222, n. 2, p. 315–22.

COHN, M., GIANNOYLIS, I., DE BELDER, M., SAINT-CYR, J. A., MCANDREWS, M. P., 2016. Associative reinstatement memory measures hippocampal function in Parkinson's Disease. **Neuropsychologia**, v. 90, p. 25-32.

CONSONI, F. T., VITAL, M. A., ANDREATINI, R., 2006. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 6, p. 451-8.

CRYAN J. F., VALENTINO R. J., LUCKI I., 2005. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 29, p. 547:569.

CURRIER, M.B. AND NEMEROFF, C. B., 2010. Inflammation and mood disorders: proinflammatory cytokines and the pathogenesis of depression. *Antiinflamm Antiallergy Agents*. **Med Chem**, v. 9, p. 212–20.

CURTIS, N. R., DIGGLE, H. J., KULAGOWSKI, J. J., LONDON, C., GRIMWOOD, S., HUTSON, P. H., MURRAY, F., RICHARDS, P., MACAULAY, A., WAFFORD, KA. 2003. Novel N1-(benzyl) Cinnamamide Derived NR2B Subtype-Selective NMDA Receptor Antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v. 213, n. 4, p. 693-696.

DA CUNHA, C., GEVAERD, M.S., VITAL, M. A., MIYOSHI, E., ANDREATINI, R., SILVEIRA, R., TAKAHASHI, R.N., CANTERAS, N.S., 2001. Memory disruption in rats with nigral lesion induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behav. Brain Res**, v. 124, p. 9-18.

DA CUNHA, C., WIETZIKOSKI, S, WIETZIKOSKI, E.C., MIYOSHI, E., FERRO, M.M., FRANCI, J. A. A., CANTERAS, N.S., 2003. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiol. Learning Memory**, v. 79, p. 236-242.

DANTZER, R., BLUTHE, R. M., KOOB, G. F., LE MOAL, M., 1987. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, p. 363-368.

DETKE, M. J., RICKELS, M., LUCKI, I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, p. 66–72.

DU JARDIN, K. G., LIEBENBERG, N., MÜLLER, H. K., ELFVING, B., SANCHEZ, C., WEGENER, G., 2016. Differential interaction with the serotonin system by S ketamine, vortioxetine, and fluoxetine in a genetic rat model of depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 233, n. 14, p. 2813-2825.

DU JARDIN, K. G., MÜLLER, H. K., ELFVING, B., DALE, E., WEGENER, G., SANCHEZ, C., 2016. Potential involvement of serotonergic signaling in ketamine's antidepressant actions: A critical review. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 71, p. 27-38.

DUMAN, R., VOLETI, B., 2012. Signaling pathways underlying the Pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci*, v. 35, p. 47-56.

DUMAN, R. S., 2014. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections Dialogues. *Clin. Neurosci*, v. 16, p. 11-27.

DUMAN, R. S., MONTEGGIA, L. M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, v. 59, p.1116–1127.

DRUI, G., CARNICELLA, S., CARCENAC, C., FAVIER, M., BERTRAND, A., BOULET, S., SAVASTA, M., 2013. Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry*, v. 19, p. 358-367.

FARABAUGH, A.H., LOCASCIO, J.J., YAP, L., WEINTRAUB, D., MCDONALD, W.M., AGOSTON, M., ALPERT, J.E., GROWDON, J., FAVA, M., 2009. Pattern of depressive symptoms in Parkinson's disease. *Psychosomatics*, v. 50, n. 5, p. 448-54.

FERRO, M. M., BELLISSIMO, M. Y., ANSELMO-FRANCI, J. A., ANGELLUCCI, M. E. M., CANTERAS, N. S., DA CUNHA, C., 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods*, v.148, n. 1, p. 78-87.

FERRO, M. M. ; ANGELLUCCI, M. E. M. ; ANSELMO-FRANCI, J. A. ; CANTERAS, N.S. ; DA CUNHA, C., 2007. Neuroprotective effect of ketamine/xylazine in two rat model of Parkinson's disease. *Braz. J. Med. Biol, Res*, v. 40, p. 89-96.

FRISINA, P.G, HAROUTUNIAN, V., LIBOW, L.S., 2009. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 15, p. 144–8.

FUKUZAKI, K., KAMENOSONO, T. NAGATA, R., 2000. Effects of ropinirole on various parkinsonian models in mice, rats, and cynomolgus monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behavior*, v. 65, p. 503-508.

GARCIA, L. S., COMIM, C. M., VALVASSORI, S. S., RÉUS, G. Z., BARBOSA, L. M., ANDREAZZA, A. C., STERTZ, L., FRIES, G. R., GAVIOLI, E. C., KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J., 2008. Acute administration of ketamine induces antidepressant like effects in the forced swimming test and increases

BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 140-144.

GEVAERD M. S., TAKAHASHI, R. N., SILVEIRA, R., DA CUNHA, C., 2001A. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. **Brain Res. Bull**, v. 55, p. 101-106.

GIGLIUCCI, V., O'DOWD, G., CASEY, S., EGAN, D., GIBNEY, S., HARKIN, A., 2013. Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 228, n. 1, p. 157-166.

GORELL, J. M., PETERSON, E. L., RYBICKI, B. A., JOHNSON, C. C., 2004. Multiple risk factors for Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 217, n. 2, p. 169-74.

GUBELLINI, P., EUSEBIO, A., OUESLATI, A., MELON, C., KERKERIAN-LE GOFF, L., SALIN, P., 2006. Chronic high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-DOPA treatment in experimental parkinsonism: effects on motor behaviour and striatal glutamate transmission. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 6, p.1802–1814.

GLUE, P., GULATI, A., LE NEDELEC, M., DUFFULL, S., 2011. Dose- and exposure response to ketamine in depression. **Biol Psychiatry**, v. 70:e9, n.10, p. e11–12.

HAMMER, M. J., BARLOW, S. M., 2010. Laryngeal somatosensory deficits in Parkinson's disease: implications for speech respiratory and phonatory control. **Exp Brain Res**, v. 201, n. 3, p. 401–409.

HANCOCK, D. B., MARTIN, E. R., MAYHEW, G. M., STAJICH, J. M., JEWETT, R., STACY, M. A., SCOTT, B. L., VANCE, J. M., SCOTT, W. K., 2008. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. **BMC Neurol**, v. 8, p. 6.

HO, Y.J., HO, S.C., PAWLAK, C.R., YEH, K.Y., 2011. Effects of D-cycloserine on MPTP-induced behavioral and neurological changes: potential for treatment of Parkinson's disease dementia. **Behav. Brain Res**, v. 219, n. 2, p. 280-290.

HSIEH, M.H., GU, S.L., HO, S.C., PAWLAK, C.R., LIN, C.L., HO, Y.J., LAI, T.J., WU, F.Y., 2012. Effects of MK-801 on recognition and neurodegeneration in na MPTP-induced Parkinson's rat model. **Behav. Brain Res**, v. 229, n. 1, p. 41-47.

IACHININOTO, M.G., NUZZOLO, E.R., BONANNO, G., MARIOTTI, A., PROCOLI, A., LOCATELLI, F., DE CRISTOFARO, R., RUTELLA, S., 2013. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibition 71 Constrains Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Activity in Acute Myeloid Leukaemia Cells. **Molecules**, v. 18, p. 10132-10145.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016.

JANKOVIC, J., 2008. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis *Journal of Neurology*. **Neurosurgery & Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368–376.

KALF, J. G., BORM, G. F., DE SWART, B. J., BLOEM, B. R., ZWARTS, M. J., MUNNEKE, M., 2011. Reproducibility and validity of patient-rated assessment of speech, swallowing, and saliva control in Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 92, p. 1152–1158.

KANDA, F., OISHI, K., SEKIGUCHI, K., KUGA, A., KOBESSHO, H., SHIRAFUJI T., HIGUCHI, M., ISHIHARA, H., 2008. Characteristics of depression in Parkinson's disease: evaluating with Zung's Self-Rating Depression Scale. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14, n. 1, p. 19-23.

KARUNANAYAKA, P. R., LEE, E. Y., LEWIS, M. M., SEN, S., ESLINGER, P. J., YANG, Q. X., HUANG, X., 2016. Default mode network differences between rigidity- and tremor-predominant Parkinson's disease. **Cortex**, v. 81, p. 239-50.

KELM-NELSON, C. A., BRAUER, A.F., CIUCCI, M. R., 2016. Vocal training, levodopa, and environment effects on ultrasonic vocalizations in a rat neurotoxin model of Parkinson disease. **Behav Brain Res**, v. 307, p. 54–64.

KELSEY, J.E., MAGUE, S.D., PIJANOWSKI, R.S., HARRIS, R.C., KLECKNER, N.W., MATTHEWS, R.T., 2004. NMDA receptor antagonists ameliorate the stepping deficits produced by unilateral medial forebrain bundle injections of 6-OHDA in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 175, n. 2, p.179-188.

JELLINGER, K. A., 2012. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. **Mov Disord**, v. 27, n. 1, p. 8-30.

LAURENCIN, C., DANAILA, T., BROUSSOLLE, E., THOBOIS, S., 2016. Initial treatment of Parkinson's disease in 2016: The 2000 consensus conference revisited. **Rev Neurol (Paris)**, v. 172, n. 8-9, p. 512-52.

LANGSTON, J. W., BALLARD, P. A., JR., 1983. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **N Engl J Med**, v. 309, n. 5, p. 310.

LEE, A. AND GILBERT, R. M., 2016. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurol Clin**, v. 34, n. 4, p. 955-965.

LEENTJENS, A.F., VAN DEN AKKER, M., METSEMAKERS, J.F., LOUSBERG, R., VERHEY, F.R., 2003. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. **Mov Disord**, v. 18, n. 4, p. 414-8.

LEES A. J., HARDY J., REVESZ T., 2009. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, p. 2055-2066.

LI, N., LEE, B. Y., LIU, R. J., BANASR, M., DWYER, J., IWATA, M., LI, X. Y. AGHAJANIAN, G., DUMAN, R.S., 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, p. 959-964.

LI, Y., ZHU, Z. R., OU, B. C., WANG, Y. Q., TAN, Z. B., DENG, C. M., GAO, Y. Y., TANG, M., SO, J. H., MU, Y. L., ZHANG, L. Q., 2015. Dopamine D2/D3 but not dopamine D1 receptors are involved in the rapid antidepressant-like effects of ketamine in the forced swim test. **Behav Brain Res**, v. 279, p.100-5.

LIMA, M. M. S., E. F. MARTINS, A. M. DELATTRE, M. B. PROENCA, M. A. MORI, B. CARABELLIAND A. C. FERRAZ. 2012B. Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease - a Review of Clinical and Experimental Studies. **CNS NeurolDisord Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 439-49.

LIMA, M. M. S., REKSIDLER, A. B., ZANATA, S., MACHADO, H. B., TUFIK, S., VITAL, M. A. B. F., 2006. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain. Res**, v. 1101, p. 117–25.

LIMA, M. M. S., REKSIDLER A. B., VITAL, M. V., 2009B. The neurobiology of the substantia nigra pars compacta: from motor to sleep regulation. **Journal Neural Transm**, v. 73, p.135-145.

LINDGREN, H. S., DUNNETT S. B., 2012. Cognitive dysfunction and depression in Parkinson's disease: what can be learned from rodent models? **Eur J Neurosci**, v. 35, n. 12, p. 1894-907.

LIU, J., LI, T., THOMAS, J. M., PEI, Z., JIANG, H., ENGELENDER, S., ROSS C. A., SMITH, W. W., 2016. Synphilin-1 attenuates mutant LRRK2-induced neurodegeneration in Parkinson's disease models. **Hum Mol Genet**, v. 25, n. 4, p. 672 80.

MARINELLI, L., COSCONATI, S., STEINBRECHER, T., LIMONGELLI, V., BERTAMINO, A., NOVELLINO, E., CASE, D. A., 2007. Homology Modeling of NR2B Modulatory Domain of NMDA Receptor and Analysis of Ifenprodil Binding. **Chem. Med. Chem**, v. 2, n. 10, p. 1498-1510.

MATHEW, S. J., MANJI, H. K., CHARNEY, D. S., 2008. Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 2080–2092.

MARTYNHAK, B. J., CORREIA, D., MORAIS, L. H., ARAUJO, P., ANDERSEN, M. L., LIMA, M. M., LOUZADA, F. M., ANDREATINI, R., 2011. Neonatal exposure to constant light prevents anhedonia-like behavior induced by constant light exposure in adulthood. **Behav Brain Res**, v. 222, p.10-4.

MAYEUX, R., STERN, Y., WILLIAMS, J. B., COTE, L., FRANTZ, A., DYRENFURTH, I., 1986. Clinical and biochemical features of depression in Parkinson's disease. **Am J Psychiatry**, v. 143, n. 6, p. 756-9.

MEREDITH, G.E., SONSALLA, P., CHESSELET, M.F., 2008. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta Neuropathol**, v. 15, n. 4, p. 385–398.

MILLER, R. L., JAMES-KRACKE M., SUN G. Y., SUN A. Y., 2009. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 4, n. 1, p. 55-65.

MIYOSHI, E., WIETZIKOSKI, S., CAMPLESSEI, M., SILVEIRA, R., TAKAHASHI, R.N., DA CUNHA, C., 2002. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Res. Bull**, v. 58, p. 41-47.

MORI, A., OHASHI, S., NAKAI, M., MORIIZUMI, T., MITSUMOTO, Y., 2005. Neural mechanisms underlying motor dysfunction as detected by the tail suspension test in MPTP-treated C57BL/6 mice. **Neurosci Res**, v. 51, n. 3, p. 265-274.

MUNHOZ, R. P., MORO, A., SILVEIRA-MORIYAMA, L., TEIVE, H.A., 2015. Non-motor signs in Parkinson's disease: a review. **Arq. Neuropsiquiatr**, v. 73, p. 454–462.

MURROUGH, J. W., GALLO, J. M., COLLINS, K. A., AAN HET ROT, M., CHARNEY, D. S., 2010. Reply to: Dose- and exposure-response to ketamine in depression. **Biol Psychiatry**, v. 70, p. e11– e12,

NAUGHTON, M., CLARKE, G., O'LEARY, O. F., CRYAN, J. F., DINAN, T. G., 2014. A review of ketamine in affective disorders: current evidence of clinical efficacy, limitations of use and pre-clinical evidence on proposed mechanisms of action. **J Affect Disord**, v. 156, p. 24-35.

NISHIDA, N., TAGUCHI, A., MOTOYOSHI, K., HYODO, M., GYO, K., DESAKI, J., 2013. Age-related changes in rat intrinsic laryngeal muscles: analysis of muscle fibers, muscle fiber proteins, and subneural apparatuses. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 270, n. 3, p. 975–984.

ONU - Organização das Nações Unidas, 2014.

Organização Mundial de Saúde, 2016.

PAOLETTI, P. E NEYTON, J., 2007. NMDA receptor subunits: Function and pharmacology. **Curr. opinion pharm**, v. 7, n. 1, p. 39-47.

PAXINOS, G., WATSON, C., 2005. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.: Academic Press, San Diego.

PEREIRA, M., ANDREATINI, R., SCHWARTING, R.K.W., BRENES, J.C., 2014. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? **Psychopharmacol**, v. 231, n. 13, p. 2567–2577.

PILC, A., WIEROŃSKA, J. M., SKOLNICK, P., 2013. Glutamate-based antidepressants: preclinical psychopharmacology. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1125-32.

PILLON, B., BOLLER, F., LEVY, R., DUBOIS, B., 2001. Cognitive deficits and dementia in Parkinson's Disease. In Boller, F. & Cappa, S.F. Handbook of neuropsychology. **Aging and dementia**, v. 6, p. 311 312.

PLOWMAN-PRINE, E. K., SAPIENZA, C. M., OKUN, M. S., POLLOCK, S. L., JACOBSON, C., WU, S. S., ROSENBEEK, J. C., 2009. The relationship between quality of life and swallowing in Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 24, n. 9, p. 1352.

POLITIS, M., WU, K., LOANE, C., QUINN, N.P., BROOKS, D.J., OERTEL, W.H., BJÖRKLUND, A., LINDVALL, O., PICCINI, P., 2012. Serotonin neuron loss and nonmotor symptoms continue in Parkinson's patients treated with dopamine grafts. **Sci. Transl**, v. 4, n. 128, p. 128-41.

POSTUMA, R. B., AARSLAND, D., BARONE P., BURN, D. J., HAWKES, C. H., OERTEL, W., ZIEMSEN, T., 2012. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. **Mov. Disord**, v. 27, n. 5, p. 617–626.

POSTUMA, R. B., J. F. GAGNON, J. MONTPLAISIR (2010). Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 81, n. 9, p. 1008-1013.

PREDIGER, R. D. BATISTA, L. C., MEDEIROS, R., PANDOLFO, P., FLORIO, J. C., TAKAHASHI, R. N., 2006. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 202, n. 2, p. 391-403.

PREDIGER, R. D. S., BATISTA, L. C., MIYOSHI, E., TAKAHASHI, R. N., 2004. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behav Brain Res**, v. 153, p. 149-157.

PREDIGER, R. D., AGUIAR, A. S. JR., ROJAS-MAYORQUIN, A. E., FIGUEIREDO, C. P., MATHEUS, F. C., GINESTET, L., CHEVARIN, C., BEL, E. D., MONGEAU, R., HAMON, M., LANFUMEY, L., RAISMAN-VOZARI, R., 2010. Single intranasal administration of 1 methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotox Res. Feb**, v. 7, n. 2, p. 114-29.

RIEDEL, O., KLOTSCHKE, J., SPOTTKE, A., DEUSCHL, G., FÖRSTL, H., HENN, F., HEUSER, I., OERTEL, W., REICHMANN, H., RIEDERER, P.,

TRENKWALDER, C., DODEL, R., WITTCHEN, H.U., 2010. Frequency of dementia, depression, and other neuropsychiatric symptoms in 1,449 outpatients with Parkinson's disease. **J. Neurol**, v. 257, p. 1073–1082.

RINGEL, L. E., BASKEN, J. N., GRANT, L. M., CIUCCI, M. R., 2013. Dopamine D1 and D2 receptor antagonism effects on rat ultrasonic vocalizations. **Behav Brain Res**, v. 252, p. 252–259.

RIPPBERGER, H., VAN GAALEN, M. M., SCHWARTING, R. K. W., WÖHR, M., 2015. Environmental and pharmacological modulation of amphetamine-induced 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Curr. Neuropharmacol**, v. 13, n. 2, p. 220.

SANTIAGO R. M., TONIN, F. S., BARBIERO J., ZAMINELLI, T., BOSCHEN S. L., ANDREATINI, R., DA CUNHA C., LIMA, M. M. S., VITAL, M. A. B. F. 2015. The Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Piroxicam Reverses the Onset of Depressive-Like Behavior in 6-OHDA Animal Model Of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 300, p. 246–253.

SANTIAGO, R. M., BARBIEIRO, J., LIMA, M. M., DOMBROWSKI, P. A., ANDREATINI, R., VITAL, M. A., 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 6, p. 1104-14.

SCHINTU, N., ZHANG, X., SVENNINGSSON, P., 2012. Studies of depression-related states in animal models of Parkinsonism. **J Parkinsons Dis**, v. 2, n. 2, p. 87-106.

SCHWARTING, R., CAREY, R.J., 1985. Deficits in inhibitory avoidance after neurotoxic lesions of the ventral striatum are neurochemically and behaviorally selective. **Behav. Brain Res**, v. 18, p. 279–283.

SCHWARTING, R. K., HUSTON, J. P., 1996. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Prog. Neurobiol**, v. 49, p. 215-266.

SHARMA, S., MOON, C. S., KHOGALI, A., HAIDOUS, A., CHABENNE, A., OJO, C., JELEBINKOV, M., KURDI, Y., EBADI, M. 2013. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). **Neurochem Int**, v. 63, n. 3, p. 201-29.

SHARMAN, M., VALABREGUE, R., PERLBARG, V., MARRAKCHI-KACEM, L., VIDAILHET, M., BENALI, H., BRICE, A., LEHÉRICY, S., 2013. Parkinson's disease patients show reduced cortical-subcortical sensorimotor connectivity. **Mov Disord**, v. 28, n. 4, p. 447-454.

SHERMAN, S. J., ESTEVEZ, M., MAGILL, A. B., FALK, T., 2016. Case reports showing a long-term effect of subanesthetic ketamine infusion in reducing L-DOPA induced dyskinesias. **Case Rep. Neurol**, v. 8, n. 1, p. 53-58.

SHI, L. H., LUO, F., WOODWARD, D. J., CHANG, J. Y., 2006. Basal ganglia neural responses during behaviorally effective deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in rats performing a treadmill locomotion test. **Synapse**, v. 59, n. 7, p. 445–457.

SLATTERY, D. S., CRYAN, J. F., 2012. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nat Protoc**, v. 7, p. 1009-1014.

SOLARI, N., BONITO-OLIVA, A., FISONE, G., BRAMBILLA, R., 2013. Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models. **Learn Mem**, v. 20, n. 10, p. 592-600.

SPENCER, K. A., ROGERS, M. A., 2005. Speech motor programming in hypokinetic and ataxic dysarthria. **Brain**, v. 94, n. 3, p. 347-66.

STAHL S. M., 2006. Psicofarmacologia. 2ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 135;217;219;385;502.

STARR, R., WILLSON, T.A., VINEY, E.M., MURRAY, L.J., RAYNER, J.R., JENKINS, B.J., GONDA, T.J., ALEXANDER, W.S., METCALF, D., NICOLA, N.A., AND HILTON, D.J., 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. **Nature**, v. 387, p. 917–921.

STOLL, L., HALL, J., VAN BUREN, N., HALL, A., KNIGHT, L., MORGAN, A., ZUGER, S., VAN DEUSEN, H., GENTILE, L. 2007. Differential regulation of ionotropic glutamate receptors. **Biophys. J**, v. 92, n. 4, p. 1343-1349.

SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M. F., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 106, n. 107, p. 17-32.

SUNG, H. Y., KIM, J. S., LEE, K. S., KIM, Y. I., SONG, I. U., CHUNG, S. W., CHOI, M. G., 2010. The prevalence and patterns of pharyngoesophageal dysmotility in patients with early stage Parkinson's disease. **Mov disord**, v. 25, n. 14, p. 2361.

SUZUKI, T., CONNOR, P., LEE, K., BLESS, D. M., FORD, C. N., INAGI, K. 2002. Age-related alterations in myosin heavy chain isoforms in rat intrinsic laryngeal muscles. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 111, n. 1, p. 962–967.

SVENNINGSSON, P., WESTMAN, E., BALLARD, C., AARSLAND, D., 2012. Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment. **Lancet Neurol**, v.11, n. 8, p. 697-707.

TADAIESKY, M. T., DOMBROWSKI, P. A., FIGUEIREDO, C. P., CARGNIN-FERREIRA, E., DA CUNHA, C., TAKAHASHI, R. N., 2008A. Emotional, Cognitive and Neurochemical Alterations in a Premotor Stage Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 156, p. 830-840.

TADAIESKY, M.T., DOMBROWSKI, P.A., DA CUNHA, C., TAKAHASHI, R.N., 2010. Effects of SR141716A on cognitive and depression-related behavior in an

animal model of premotor Parkinson's disease. **Parkinsons Dis**, v. 2010, p. 238491.

TICKHONOVA, I. G., BASKIN, I. I., PALYULIN, V. A., ZEFIROV, N. S., BACHURIN, S. O., 2002. Structural Basis for Understanding Structure-Activity Relationships for the Glutamate Binding Site of the NMDA Receptor. **J. Med. Chem**, v. 45, n. 18, p. 3836-3843.

TÖLLE, T. R., BERTHELE, A., ZIEGLGÄNSBERGER, W., SEEBURG, P. H., WISDEN, W., 2003. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. **J. Neurosci**, v. 13, n. 12, p. 5009-5028.

TORBEY, E., PACHANA, N. A., DISSANAYAKA, N. N., 2015. Depression rating scales in Parkinson's disease: a critical review updating recent literature. **J. Affect Disord**, v. 184, p. 216–224.

VECCHIA, D. D., SCHAMNE, M. G., FERRO, M. M., SANTOS, A. F. C., LATYKI, C. C., LARA, D. V., BEN, J., MOREIRA, E. L., PREDIGER, R. D., MIYOSHI, E., 2015. Effects of *Hypericum perforatum* on turning behavior in an animal model of Parkinson's disease. **Braz. J. of Pharm. Sci**, v. 51, p. 111-115.

VLAMINGS, R., VISSER-VANDEWALLE, V., KOOPMANS, G., JOOSTEN, E. A., KOZAN, R., KAPLAN, S., STEINBUSCH, H. W., TEMEL, Y., 2007. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus improves speed of locomotion but impairs forelimb movement in Parkinsonian rats. **Neuroscience**, v. 148, n. 3, p. 815-23.

WALSH, B., SMITH, A., 2012. Basic parameters of articulatory movements and acoustics in individuals with Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 27, p. 843–850.

WESTIN, J. E., JANSSEN, M. L., SAGER, T. N., TEMEL, Y., 2012. Automated gait analysis in bilateral Parkinsonian rats and the role of L-DOPA therapy. **Behav. Brain Res**, v. 226, n. 2, p. 519–528.

WICKREMARATCHI, M. M., KNIPE, M. D., SASTRY, B. S., MORGAN, E., JONES, A., SALMON, R., WEISER, R., MORAN, M., DAVIES, D., EBENEZER, L., RAHA, S., ROBERTSON, N. P., BUTLER, C. C., BEN-SHLOMO, Y., MORRIS, H. R., 2011. The motor phenotype of Parkinson's disease in relation to age at onset. **Mov Disord**, v. 26, n. 3, p. 457–463.

WINTER, C., VON RUMOHR, A., MUNDT, A., PETRUS, D., KLEIN, J., LEE, T., MORGENSTERN, R., KUPSCH, A., JUCKEL, G., 2007. Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. **Behav. Brain Res**, v. 184, n. 2, p. 133-141.

WÖHR, M., HOUX, B., SCHWARTING, R. K. W., SPRUIJT, B., 2008. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. **Physiol Behav**, v. 93, n. 4-5, p. 766–776.

WÖHR, M., SCHWARTING, R.K.W., 2013. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell Tissue Res**, v. 354, n. 1, p. 81–97.

WÖHR, M., ROULLET, F.I., HUNG, A.Y., SHENG, M., CRAWLEY, J.N., 2011. Communication impairments in mice lacking Shank1: Reduced levels of ultrasonic vocalizations and scent marking behavior. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 620-631.

WÖHR, M., SCHWARTING, R.K.W., 2008. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. **Behav Neurosci**, v. 122, n. 2, p. 310-330.

WÖHR, M., SCHWARTING, R.K.W., 2012. Testing social acoustic memory in rats: Effects of stimulus configuration and long-term memory on the induction of social approach behavior by appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. **Neurobiol Learn Mem**, v. 98, n. 2, p. 154-164.

WÖHR, M., SCHWARTING, R.K.W., 2013. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell Tissue Res**, v. 354, n. 1, p. 81–97.

WRIGHT, J., DOBOSIEWICZ, M. S., CLARKE, P. S., 2013. The role of dopaminergic transmission through D1-like and D2-like receptors in amphetamine-induced rat ultrasonic vocalizations. **Psychopharmacolog**, v. 225, n. 4, p. 853–868.

YANG, C., HU, Y. M., ZHOU, Z. Q., ZHANG, G. F., YANG, J. J., 2013. Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. **Ups J Med Sci**, v. 118, n. 1, p. 3-8.

ZANGERL, A. D., SEPPI, K. WENNING G. K., TRINKA, E., RANSMAYR, G., OBERAIGNER, W., POEWE, W., 2009. Mortality in Parkinson's disease: a 20 year follow-up study. **Mov Disord**, v. 24, n. 6, p. 819–825.

ZANOS, P., PIANTADOSI, S. C., WU, H. Q., PRIBUT, H. J., DELL, M. J., CAN, A., SNODGRASS, H. R., ZARATE, C. A. JR., SCHWARCZ, R., GOULD, T. D., 2015. The Prodrug 4-Chlorokynurenine Causes Ketamine-Like Antidepressant Effects, but Not Side Effects, by NMDA/GlycineB-Site Inhibition. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 355, n. 1, p. 76-85.

ZARATE, C. A., QUIROZ, J., PAYNE, J., MANJI, H. A., 2002. Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 36, p. 35-83.

ZHOU, M., ZHANG, W., CHANG, J., WANG, J., ZHENG, W., YANG, Y., WEN, P., LI, M., XIAO, H., 2015. Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 584, p. 184–189.